

**SZENT ISTVÁN EGYETEM  
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR**

**A MAGYARORSZÁGON ELŐFORDULÓ FITOPLAZMÁK MOLEKULÁRIS  
BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSA ÉS  
TANULMÁNYOZÁSA**

**Doktori értekezés**

**Viczián Orsolya**

**Gödöllő  
2002**

**A doktori iskola**

**Megnevezése:** Multidiszciplináris Agrártudományok  
**Tudományága:** Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok  
**Vezetője:** Papp János, DSc.  
Tanszékvezető egyetemi tanár  
Szent István Egyetem Kertészettudományi Kar,  
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

**Témavezető:** Süle Sándor, DSc.  
Tudományos tanácsadó, Osztályvezető  
Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Kutatóintézete  
Biotechnológia Osztály  
Tanszékvezető  
Szent István Egyetem Kertészettudományi Kar  
Növénykórtani Tanszék

**A program és a témavezető jóváhagyó aláírása:**

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

**A doktori iskola vezetője**

**Programvezető**

**Témavezető**

# Tartalomjegyzék

	oldalszám
Jelölések és rövidítések jegyzéke	5
<b>1. BEVEZETÉS</b>	<b>7</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>9</b>
2.1. A fitoplazmák rendszertani besorolása	9
2.2. A fitoplazmák alakja, finomszerkezete és a növényen belüli előfordulásuk	14
2.3. A fitoplazmák növények közti terjedése	15
2.4. Patogenezis, növényélettani változások	16
2.5. A fitoplazmák kimutatása és azonosítása	18
2.6. A fitoplazmák fenntartása	20
2.7. A fitoplazmák elleni védekezés	21
2.8. Fitoplazma körkép Magyarországon az ezredfordulóig	21
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>23</b>
3.1. Növényi anyagok	23
3.2. A fitoplazmák fenntartása	23
3.3. A fitoplazma fertőzés kimutatására alkalmazott módszerek	23
3.3.1. Epifluoreszcens kimutatási módszer - DAPI teszt	23
3.3.2. Kimutatás és meghatározás molekuláris biológiai módszerekkel	24
3.3.2.1. DNS kivonás	24
3.3.2.2. Hibridizálás-dot blot	27
3.3.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR, polymerase chain reaction)	29
3.3.2.4. Restrikciós fragment analízis (RFLP, restriction fragment length polymorphism)	30
3.4. Immunológiai eljárások	30
3.4.1. Fehérje tisztítás	30
3.4.2. Immunoblot	31
3.4.2.1. Fág könyvtár titrálása	31
3.4.2.2. Fág könyvtár fenntartása	31
3.4.2.3. Fág könyvtár szűrése - immunoblot	32
3.5. Egyéb alkalmazott módszerek	33
3.5.1. Klónozás	33
3.5.2. Transzformálás	34
3.5.3. Plazmid kivonás és plazmid méretének meghatározása	35
3.5.4. Fehérje termeltetés és tisztítás	35
<b>4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b>	<b>37</b>
4.1. Fitoplazma fertőzések okozta tünetek	37
4.2. Az egyes fitoplazma csoportok kimutatása és meghatározása	50
4.2.1. Epifluoreszcens kimutatási módszer-DAPI teszt	50
4.2.2. Fitoplazmák kimutatása és meghatározás molekuláris biológiai módszerekkel	50
4.2.2.1. Mintavétel	50
4.2.2.2. DNS kivonás	51
4.2.2.3. DNS hibridizálás-dot blot	52
4.2.2.4. Polimeráz láncreakció (PCR, polymerase chain reaction)	52

4.2.2.5. Restriktációs fragment analízis (RFLP, restriction fragment length polymorphism)	54
4.3. A Magyarországon előforduló fitoplazmák és gazdanövénykörük	55
4.4. Fitoplazmák fenntartása	58
4.5. Fitoplazma gének keresése és vizsgálata	59
4.5.1. Fitoplazma gének keresése	59
4.5.2. Az AP fitoplazma <i>tuf</i> génjének klónozása expressziós plazmidba antiszérum előállítás céljára	61
5. ÖSSZEFOGLALÁS	69
6. IRODALOMJEGYZÉK	75
7. MELLÉKLETEK	87
1. Melléklet: Közlemények	87
2. Melléklet: Ábrajegyzék	89
3. Melléklet: A fitoplazmák jelenlegi besorolása	91
Köszönetnyilvánítás	
103	
Nyilatkozat	
105	

## Jelölések és rövidítések jegyzéke

AAV	American Aster Yellows (öszirózsa sárgulás fitoplazma)
annealing	a primer homológ DNS szakaszhoz történő tapadása
AP	Apple Proliferation (almafa boszorkányseprűsödés fitoplazma)
A-T klónozó plazmid	speciális lineáris plazmid, amelynek klónozó helye timinre végződik
BSA	Bovine Serum Albumin (marha szérum albumin)
CPh	Clover Phyllody (herevirág elleveledése fitoplazma)
CsCl-EtBr	cézium klorid-etidium bromid
CTAB	hexadeciltrimetilammónium bromid
DAPI	4-6-diamidino-2-fenilindol
DIG	digoxigenin
DMSO	metil szulfoxid
DNS próba	rövid (20-néhány száz bp) specifikus DNS szakasz
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESFY	European Stone Fruit Yellows (csonthéjasok európai sárgulás fitoplazma)
IPTG	$\beta$ -D-thiogalactopiranosid
LB	Luria-Bertani táptalaj
nested PCR	két egymást követő szaporítási szakasz, amely során először a nagyobb szakaszt szaporítjuk fel és ezt használjuk templát DNS-ként a második szakaszban
OD	Optikai Denzitás
PAGE	poliakrilamid gél-elektroforézis
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
PFU	1ml-ben levő fág részecske szám
PVP	polivinilpolipirrolidon
primer	indítószakasz; a felszaporítandó DNS-el (speciális esetektől eltekintve) homológ 15-25 bp hosszúságú szakasz
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism - restrikciós fragment analízis
SDS	nátrium dodecil szulfát
Southern blot	DNS-DNS hibridizáció
SSC	Saline nátrium citrát puffer
Templát DNS	minta DNS
TRIS	tris (hidroximetil) aminometán



## 1. BEVEZETÉS

Az utóbbi években nagy számban találtunk gyümölcsösökben és zöldségveteményekben sárgulásos és boszorkányseprűs tüneteket mutató növényeket. Sokszor a virágok megváltozott alakja és színe hívta fel a figyelmet, hogy valamilyen szokatlan betegséggel állunk szemben. A tünetek néhány növényfaj esetében olyan súlyosak voltak, hogy jelentős terméseszköket, vagy minőségi romlást okoztak. Ez a több évtizedre telepített kultúrák esetében különösen nagy gazdasági kárt jelentett. A tünetek hátterében nem vírus, baktérium, vagy gomba kórokozó állt, ezért vizsgáltuk meg a beteg növények esetleges fitoplazma fertőzöttségét. A minták jelentős hányadánál igazolni tudtuk a kórokozó jelenlétét. Ezen elsődleges tapasztalatok, és más hazai növénykórtannal foglalkozó szakemberek (Szirmai, 1956; Petrőczy, 1958; Gáborjányi és Lönhárd, 1967; Horváth, 1969; Kuroli, 1970) korábbi megfigyelései alapján feltérképeztük a fitoplazmák előfordulási helyeit, gazdanövénykörét és jelenlevő csoportjait Magyarországon. A vizsgálatok során nemcsak gyümölcsfák és zöldségvetemények, hanem gyomok és dísnövények szöveteiben is kimutattunk fitoplazma fertőzést. Vizsgálati módszereinket az irodalomban leírt, illetve külföldön használt korszerű mikroszkópos és molekuláris biológiai módszerek alapján alakítottuk ki.

### Célkitűzéseink

Elsősorban a hazánkban előforduló fitoplazmák kimutatását, és az egyes csoportok azonosítását kívántuk megvalósítani molekuláris biológiai módszerekkel. A vizsgálatok lehetőséget adtak az eddig Magyarországon leírt, hagyományos módszerekkel azonosított fitoplazmák, valamint a megfigyelt tünetek, és az elmúlt években felderített fitoplazmás betegségek összehasonlítására; egyes esetekben a kiigazításra. Ezáltal a jelenleg feltérképezett gazdanövénykör és a betegség előfordulási helyei is összevetésre kerülhettek a hazai irodalomban már előzőleg közölt adatokkal.

A fitoplazmák patogenitásáról eddig még nagyon keveset tudunk. A kórokozó jobb megismerése magában hordozza az ellene való védekezés lehetőségét is, ezért célul tűztük ki a fitoplazma gének keresését és vizsgálatát. A terjedés mértékét figyelembe véve felvetődik az igény a könnyű és olcsó ELISA eljárás alkalmazására a gyakorlatban. Ennek segítségével az országba behozott, vagy már bent levő fertőzött növényanyag egyszerűen kiszűrhető, valamint ezzel együtt a kórokozó terjedése is visszaszorítható.

A kórokozók terjedését az utóbbi évtizedben csökkentett mértékű növényvédelmi gyakorlat hatásának tulajdoníthatjuk, így a gyomok vizsgálatára a jövőben még nagyobb hangsúlyt kívánunk helyezni, hiszen a fitoplazmák bizonyítottan ezekben a növényekben is áttelelnek, és következő évben fertőzési forrássul szolgálnak a fogékony szervezeteknek.

Az eddig leírtak egyértelműen rávilágítanak a fitoplazma kutatás jelentőségére. A nagymértékű gazdasági kár, a betegség terjedésének növekedése, és a kórokozóról rendelkezésünkre álló kevés tudásanyag a kutatások folytatására ösztönöz.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A fitoplazmák -régebbi nevükön mikoplazmák (MLO-mycoplasmalike organism-mikoplazma-szerű szervezetek) sejtfal nélküli, táptalajon nem tenyésztethető növényi kórokozók.

### 2.1. A fitoplazmák rendszertani besorolása

A fitoplazmák rendszertani elhelyezése ma még nem teljesen tisztázott, de az utóbbi évtizedekben rohamosan fejlődésnek indult molekuláris genetikai módszerek alkalmazása jelentősen megkönnyíti e sajátos kórokozó csoport rendszertani besorolását. Az 1960-as évek végéig a kórokozót mint vírust tartották számon (Samuel *et al.* 1933, Szirmai 1956), mert sok tulajdonságban hasonlóságot mutattak a legtöbb sárgulós betegséget okozó vírussal (rovarok terjesztik, szűrhetők, oltással átvihetők). 1967-ben a növénypatológusok nagy meglepetésére vírusfertőzöttnek hitt növények floemében változó alakú, azaz pleomorf, sejtfal nélküli egysejtűeket találtak (Doi *et al.*, 1967). Azóta több száz sárgulós, törpüléses, illetve seprűsödéses tüneteket mutató növényfaj esetében mutatták ki fitoplazmák jelenlétét. A jelenleg már birtokunkban levő rutinszerűen alkalmazható DNS vizsgálati módszerek hiányában kezdetben az egyes fitoplazmákat a megjelenő szimptómák, az átvitel lehetséges módja, a kórokozó növényen belüli terjedése, valamint a gazdanövénykör alapján különítették el.

A kórokozó pontosabb besorolásához az első genetikai adatot a fitoplazma DNS G+C tartalmának meghatározása adta (23.0-26.2%). Az eredményből a meglévő ismeretek tükrében arra lehetett következtetni, hogy a fitoplazmák a tenyésztethető mikoplazmákkal állnak közeli rokonságban (Kollar and Seemüller, 1989). Mára az immun- és genetikai vizsgálatok alapján (Lee *et al.*, 1993; Gundersen *et al.*, 1994; Seemüller *et al.*, 1994) világossá vált, hogy valóban a *Mollicutes* osztályba tartoznak, de csak távoli rokonságban állnak a mikoplazmákkal. Legközelebbi rokonaik az *Acholeplasma*-k. Ezért is javasolták 1994-ben a "mycoplasma-like organism" elnevezés megváltoztatását "fitoplazmára" (Sears *et al.*, 1994), amely egyértelműen jelzi e mikroorganizmusok növénykórokozó mivoltát.

A szerológiai vizsgálatokhoz olyan fitoplazma-gazdagító kivonási módszert alkalmaztak, amelyet poliklonális (Kirkpatrick, 1992) és monoklonális antiszérum előállításához használtak (Chen and Jiang., 1988; Clark *et al.*, 1989; Hsu *et al.*, 1990). Az eljárás során nagy nehézséget

jelentett fás növényekben a fitoplazmák alacsony koncentrációja, s így a magas titerű antiszérum előállítása. A kísérletekhez ezért leginkább *Catharanthus roseus*-ban (rózsameténg) fenntartott csoportokat használtak (lágyszárúakban magasabb koncentrációban van jelen a fitoplazma). Diagnosztikai szempontból a legígéretesebbnek a monoklonális antitestek tűnnek, amelyekkel már közeli rokonságban levő fitoplazmákat is el lehet különíteni (Lee *et al.*, 1993).

A fitoplazma DNS klónozásához, és a hibridizációhoz a növényi DNS-től teljesen különválasztott anyagot használtak. A tisztán csak fitoplazma DNS-t ismételt CsCl-biszbenzimid gradiens centrifugálós eljárással sikerült kinyerni (Kollar *et al.*, 1990). Az így kapott DNS-t különböző restrikciós endonukleázokkal emésztették, majd a megfelelő (1-2kb) méretű szakaszokat jól szaporodó plazmidba ligálták és abban tartották fenn. A [<sup>32</sup>P]dATP-vel jelölt próbákat dot blothoz és southern blothoz használták (Bonnet *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 1991; Harrison *et al.*, 1992; Ahrens *et al.*, 1993). A próbák nem csak a fitoplazmák kimutatására lettek alkalmasak, hanem azok emésztésével a genetikai rokonság vizsgálatára is. Sok, tüneteiben megegyező betegségről mutatták ki, hogy azokat más és más fitoplazma okozza (Kuske *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992b; Schneider and Seemüller, 1994; Kison *et al.*, 1994; Kison *et al.*, 1997).

A továbbiakban egyre kisebb erőfeszítést tettek a hibridizáció alkalmazására a fitoplazmák osztályozásában. A figyelem a konzervatív 16S rDNS szekvencia analízise felé fordult (Woese, 1987; Weisburg *et al.*, 1989). Néhány fitoplazma teljes 16S rDNS szekvenciáját meghatározták (Lim and Sears, 1989; Kirkpatrick *et al.*, 1989; Kuske *et al.*, 1992). A további vizsgálatokhoz már a kevésbé konzervatív gének analízisére tértek át; a riboszómális fehérje génekére (Gundersen *et al.*, 1994; Lim and Sears, 1992; Toth *et al.*, 1994), a 16-23SrNS spacer régiójára (Kirkpatrick *et al.*, 1994), és a TU elongációs faktort (*tuf* gén) kódoló régióra (Schneider *et al.*, 1997).

Egyszerűsége és elérhetősége miatt a fitoplazmák kimutatására és azonosítására ma széleskörűben alkalmazott módszer a 16S rDNS szekvenciája alapján készített primerekkel történő PCR, és annak felhasználásával az RFLP módszerek. Készültek univerzális, minden fitoplazma kimutatására alkalmas primer készletek (Kirkpatrick *et al.*, 1994), valamint egyes fitoplazmákra specifikusak is (Lee *et al.*, 1992; Ahrens and Seemüller, 1992; Namba *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993; Griffiths *et al.*, 1994; Maixner *et al.*, 1995; Gundersen *et al.*, 1996; Marcone *et al.*, 1997; Griffiths *et al.*, 1999). Ma ezeket a primereket széleskörűen alkalmazzák szinte minden fitoplazmákkal foglalkozó laboratóriumban. Jelenleg ez a legelérhetőbb és legérzékenyebb rutinszerű kimutatási és azonosítási módszer.

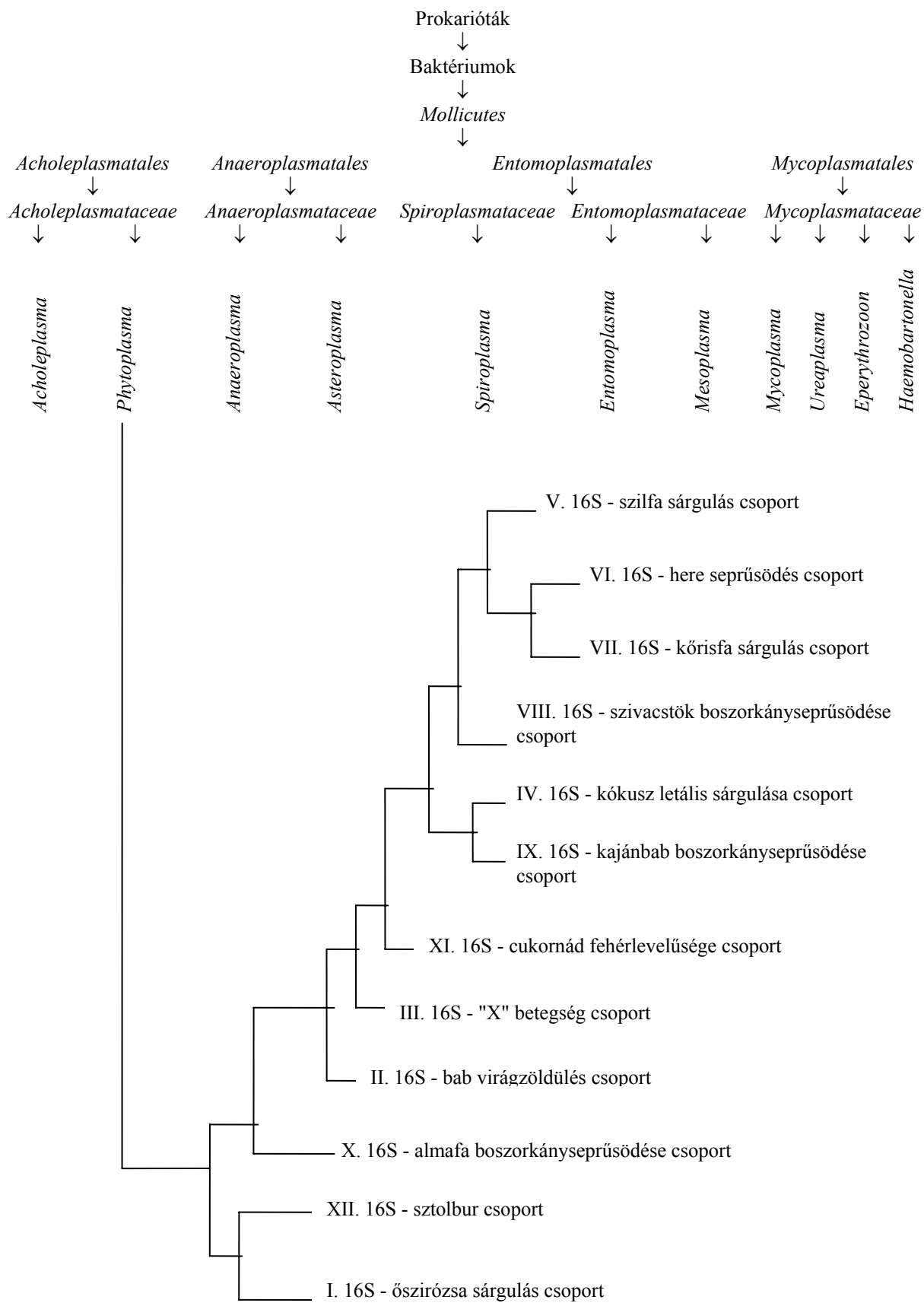
Kezdetben a különböző fitoplazmák 16S rDNS-én elhelyezkedő restrikciós vágóhelyek eltéréseinek alapján kezdték el a csoportosítást (Lee *et al.*, 1993), de később más szekvenciák analizisét is bevonták a vizsgálatokba. Az újabb adatok tükrében 14 csoportot (ún. 16S csoportot) és 32 alcsoportot különítettek el (Lee *et al.*, 1998). A 14 csoport a következő: őszirózsa sárgulás; földimogyoró seprűsödés; X-betegség; kókusz letális sárgulása; szilfa sárgulás; herevirág elleveledése; kőrísa sárgulás; szivacsstök seprűsödés; galambborsó (*Cajanus cajan*) seprűsödés; almafa seprűsödés; rizs sárgulásos törpülése; sztolbur; mexikói rózsameténg (*Cataranthus roseus*) virágzöldülése; Bermuda fű fehérlevelűsége.

Több kutatócsoport a csoportosítást a különböző fitoplazmák 16S rDNS szekvenciájának összehasonlításával végezte. A közös erőfeszítés eredményeképpen közel 30 szinte teljes hosszúságú 16S rDNS-t szekvencia bázissorrendje vált ismertté (Namba *et al.*, 1993; Gundersen *et al.*, 1994, Kirkpatrick *et al.*, 1992, Seemüller *et al.*, 1994). A csoportosítás ezen szakaszok összehasonlítása alapján történt meg (Kirkpatrick and Smart, 1995; Schneider *et al.*, 1995). Ezen osztályozás szerint a 13 csoport a következő: (1): sztolbur, (2): őszirózsa sárgulás, (3): almafa seprűsödése, (4): kókusz letális sárgulása, (5): galambborsó seprűsödés, (6): vadkender seprűsödése, (7): rizs sárgulásos törpülése, (8): szilfa sárgulás, (9): kőrísa sárgulás, (10). vitorlásvirágúak (*Crotalaria juncea*) virágelleveledése, (11): szivacsstök seprűsödés, (12): herevirág elleveledése, (13): földimogyoró seprűsödés.

Az osztályozás tökéletesítése érdekében kísérletek indultak a 16-23S rDNS spacer régiójának szekvencia összehasonlítására is (Gibb *et al.*, 1998, Kenyon *et al.*, 1998). Míg a fitoplazmák 16S rDNS-ei maximum 14 %-os eltérést mutatnak, addig a kevésbé konzervatív 16-23S rDNS spacer régiói 22%-ost. A csoportokba való besorolást tehát valóban elősegíti a fent említett szekvenciák összehasonlítása. Ez alapján a jövőben még kiegészítések várhatók.

Jelenleg a az IRPCM (Working Team on Phytoplasmas of the International Research Programme of Comparative Mycoplasmaology) indítványozta a fitoplazmák teljes 16S rDNS analizise alapján történő osztályozást. Az indítványt az ICSB (International Committee on Systematic Bacteriology) elfogadta.

A jelenleg leginkább elfogadott rendszertani besorolásuk:



1.ábra. Fitoplazmák jelenlegi rendszertani besorolása

A 16S rDNS alapján megállapított csoportokba tartozó fitoplazmák:

I. 16S - őszirózsa sárgulás csoport	<p>SAY (Western severe aster yellows, nyugati súlyos őszirózsa sárgulás)</p> <p>AAV (American aster yellows, amerikai őszirózsa sárgulás)</p> <p>AY1 (Maryland aster yellows, Maryland őszirózsa sárgulás)</p> <p>OAY (Oenothera aster yellows; ligetszépe őszirózsa sárgulás)</p> <p>MIAY (Michigan aster yellows, Michigan őszirózsa sárgulás)</p> <p>BB (tomato big bud; paradicsom óriásrügy betegség)</p> <p>CPh (clover phyllody, herevirág ellevelesedése)</p>
II. 16S - bab virágzöldülés csoport	<p>PnWB (peanut witches'-broom, földimogyoró boszorkányseprűsödés)</p> <p>SPWB (sweet potato witches'-broom, édesburgonya boszorkányseprűsödés)</p> <p>SUNHP (sunn hemp witches'-broom, bengáliai kender boszorkányseprűsödés)</p> <p>WBDL (lime witches'-broom, len boszorkányseprűsödés)</p> <p>FBP (faba bean phyllody, bab virágzöldülés)</p>
III. 16S - "X" betegség csoport	<p>CX (Canada peach X-disease, kanadai őszibarack X-betegség)</p> <p>WX (Western X-disease, nyugati X-betegség)</p> <p>TWB (Tsuwabuki witches'-broom, Tsuwabuki boszorkányseprűsödés)</p> <p>VAC (vaccinium witches'-broom, áfonya boszorkányseprűsödés)</p> <p>CYE (clover yellows edge, here levél sárgaszélűség)</p>
IV. 16S - kókusz letális sárgulása csoport	<p>LY (coconut lethal yellowing, kókusz letális sárgulás)</p> <p>LDY (Yucatan coconut lethal decline, yucatani kókusz letális sárgulás)</p> <p>LDT (Tanzanian coconut lethal decline, tanzániai kókusz letális pusztulás)</p>
V. 16S - szilfa sárgulás csoport	<p>EY1 (American elm yellows, amerikai szilfa sárgulás)</p> <p>ULW (French elm yellows, francia szilfa sárgulás)</p> <p>FD (Flavescence dorée, szőlő sárgaság)</p> <p>CLY (cherry lethal yellowing, cseresznye letális sárgulás)</p> <p>JWB (jujube witches'-broom, zsidótövis boszorkányseprűsödés)</p>
VI. 16S - here seprűsödés csoport	<p>CP (clover proliferation, here seprűsödés)</p>
VII. 16S - kőrisfa sárgulás csoport	<p>AshY (ash yellows, kőrisfa sárgulás)</p>

VIII. 16S - szivacsstök boszorkányseprűsödés e csoport	LfWB (loofah witches'-broom, szivacsstök boszorkányseprűsödés)
IX. 16S - kajánbab boszorkányseprűsödés e csoport	PPWB (pigeon pea witches'-broom, kajánbab boszorkányseprűsödés)
X. 16S - almafa boszorkányseprűsödés e csoport	AP (apple proliferation, almafa boszorkányseprűsödés)  PD (pear decline/ Italy, körte leromlás) PPER (peach decline, őszibarack leromlás) ESFY (European stone fruit yellows, csonthéjasok európai sárgulása) BAWB (buckthorn witches'-broom, benge boszorkányseprűsödés)
XI. 16S - cukornád fehérlevelűsége csoport	RYD (rice yellow dwarf, rizs sárgulások törpülés)  BVK (Leaf hopper borne - ?) SCWL (sugarcane whiteleaf, cukornád fehérlevelűsége)
XII. 16S - sztolbur csoport	STOL (stolbur of pepper, sztolbur)  VK (vergilbungskrankheit-grapevine yellows, szőlősárgulás) AUSGY (Australian grapevine yellows, ausztráliai szőlősárgulás) PYL (phormium yellows leaf, új-zélandi kender sárgulás)

Az összeállítás Seemüller *et al.* (1998) munkája alapján készült.

A fent leírtakban csak a legfontosabb fitoplazmákat említettem meg, mert a teljes felsorolás 11 oldalt foglal magába (4. Melléklet).

## 2.2. A fitoplazmák alakja, finomszerkezete és a növényen belüli előfordulásuk

Az alaktani és finomszerkezeti megfigyelések a fertőzött növények vékony metszeteinek elektronmikroszkópos vizsgálatán alapulnak.

A fitoplazmák alakja és mérete rendkívül változékony; lehetnek kicsik, gömbölyűek, erős elektrondenitásúak (60-100nm), nagy gömb, vagy henger alakúak (150-1100nm) és szabálytalan formájúak, elágazók (1-2µm-több µm) (Ploaie, 1973). A kicsi és nagy gömb alakot a fertőzés késői szakaszában, vagy az őszi hónapokban, az elágazó formát gyakran csak a betegség kezdeti stádiumában, valamint a tavaszi hónapokban figyelték meg (Hirumi and Maramorosch, 1973). Letapogató, illetve fagyasztásos-töréses elektronmikroszkópos megfigyelések alkalmával a fitoplazmáknak további formáit fedezték fel: elágazó, súlyzó és sarjadzó alakokat (Hagis and Sinha, 1978; Marwitz and Petzold, 1978).

Testük egyetlen sejtből áll, amit háromrétegű, körülbelül 10nm vastagságú citoplazma membrán határol. A sejteken belül középtájon erősen festődő DNS-ből álló magállományt, valamint a citoplazma hártáéhoz közel RNS tartalmú riboszóma-szerű képződményeket figyeltek meg (Ploaie, 1973; Florance and Cameron, 1978; Waters and Hunt 1980). Membránhoz kötött vakuólumokat és zárványtesteket egy kivételtől eltekintve nem találtak (Hirumi and Maramorosch, 1973, Douglas, 1993).

A fitoplazmák a növényekben kizárólag a floémekben fordulnak elő, és halmozódnak fel. Leginkább a teljesen kifejlett rostacsövekben találhatóak meg (néha a sejtfalhoz tapadva), de néhány esetben már megfigyeltek a parenchima és a kísérő sejtekben is (Hibino and Schneider, 1970; Hirumi and Maramorosch, 1973), bár ez a megfigyelés vitatható, mert a nem teljesen “érett” rostacső sejtek összetéveszthetők a parenchima, vagy a kísérő sejtekkel (McCoy, 1979).

A növényen belüli terjedésük módja még nem teljesen tisztázott. Néhány rostaelem több száz fitoplazma sejtet tartalmazhat, mások pedig egyet sem. Feltételezik, hogy a rosta pórusoknak fontos szerepük van a sejtek közötti vándorlásban, bár egyes megfigyelések szerint (Davis and Whitcomb, 1981) a vándorlást olyan sejtek között is megfigyelték már, amelyek között nem volt ilyen rosta pórus. Egy fitoplazma fertőzött szárdarabot elkalluszosítottak, majd az eredeti rostacsővel érintkezésben nem levő szaporodott sejtekből növényt regeneráltak. A növények 77%-a volt fertőzött. Ez alapján feltételezhető, hogy a kórokozók a plazmodezmákon keresztül is képesek terjedni.

### **2.3. A fitoplazmák növények közti terjedése**

Jelenlegi tudásunk szerint a fitoplazmák arankával (*Cuscuta campestris*), kabócákkal és oltással terjedhetnek. Megkísérelték a kórokozót mechanikai úton (a floém nedvet injektálással, bedörzsöléssel) átvinni; de eredménytelenül (Valenta, *et al.*, 1961; Ploaie, 1981). Szirmai János 1956-ban a mechanikai átviteles kísérleteken kívül, levéltetűvektorokkal is próbálkozott, szintén sikertelenül. Ellenben az oltási kísérletek eredményesnek bizonyultak (Szirmai, 1956). Az oltással történő átvitelt máig alkalmazzuk a fitoplazmák fenntartására.

Az arankával történő átvitelt már a 60-as években sikerrel alkalmazták olyan fitoplazmák esetében, amiket addig vírusnak vélték (Valenta *et al.*, 1961; Hosford, 1968; Horváth, 1972). A fitoplazma jelenlétét az aranka rostacsövében elektronmikroszkóppal igazolták (Dale and Kim, 1969; Hibben and Wolansky, 1971). A fertőzött arankán is megfigyelhetők a betegség

tünetei (bepöndörődő hajtásvég, virág deformálódása). Ez, és az átvitel ténye arra utaltak, hogy a kórokozó a rostacsőben szaporodik (Ploaie, 1981). Az átvitel sokkal hatékonyabbnak bizonyult abban az esetben, amikor a két növény közti aranka-kapcsolat a fertőzött egyedről indult. Tehát a fitoplazmák mozgása az aranka hajtásában sokkal aktívabb a növekedés irányában (Carraro *et al.*, 1991).

Ma már jól ismert tény, hogy a fitoplazmákat számos kabócafaj is terjeszti; legtöbbjük a *Daltocephalidae* család tagjai, de találtak már átvitelre példát az *Ulopidae*, *Agaliidae*, *Lassidae*, *Macropsidae*, *Gyponidae*, *Aphrodidae*, *Tettigellidae*, *Coelidiidae*, *Cicadellidae* családban is (Metcalf, Z. P. (1927-71); Ploaie, 1981). A kórokozó kabócákkal történő terjedéséről, azóta is számos közlemény született (Golino, 1989; 1994; Maixner *et al.*, 1995; Beanland *et al.*, 1999). Vizsgálták a fitoplazmák "lappangási" idejét is kabócákban. Azt az eredményt kapták, hogy a 18°C alatti, illetve a 32°C fölötti hőmérsékleten tartott kabócákban a fitoplazmák lappangási ideje hosszabb volt. Ebből arra is következtetni lehet, hogy az évben mely időszakok kedveznek a fitoplazmák terjedésének. Néhányan a kabócák élettartamának változását figyelték meg fitoplazmát tartalmazó és nem tartalmazó egyedekben. A fertőzött rovarok átlagos élettartama szignifikánsan hosszabbnak bizonyult (Murrall *et al.*, 1996).

Az eddigi adatok alapján igen valószínű, hogy az egyes fitoplazmákat csak bizonyos rovarfajok képesek átvinni, a közleményekben az erre vonatkozó adatok kevés kivételtől eltekintve összhangban vannak (Alma *et al.*, 1997; Bosco *et al.*, 1997; Goodwin *et al.*, 1999).

## 2.4. Patogenezis, növényélettani változások

Számos súlyos és fontos fitoplazma okozta betegséget tanulmányoztak már, de egyik esetben sem találtak kielégítő magyarázatot arra, hogy mely tényezők felelősek a betegség tüneteinek (McCoy, 1979; Lepka *et al.*, 1999).

A patogenezis korai szakaszában erős floém elhalást és kallóz felhalmozódást figyeltek meg a rostacsővekben, az olyan súlyos fitoplazma betegségeknél, mint a pálma és körte leromlás, valamint az őszibarack X betegség (Braun and Sinclair, 1976; Eden-Green, 1976; Eden-Green and Tully, 1979; Schneider, 1973). A fitoplazmás őszibarack és cseresznye esetében a rostacsővek elveszítették szivárványos színüket, nagy mennyiségű kallóz halmozódott fel a rostasejtek pórusainál, majd a rosta-, parenchima- és kísérősejtek összeestek (Douglas, 1993; Schlag and Gal, 1996). A floém sejtek összeomlását már korábban is megfigyelték, AY fitoplazma jelenlétében (Esau, 1977). Enyhébb tüneteket okozó fitoplazma fertőzéskor (AY, BB, burgonya boszorkányseprűsödés stb.) a floém elhalás általában nem fordul elő, de



jellemző a hajtások és levelek deformálódása (Bowyer *et al.*, 1969; Hull *et al.*, 1971). Ezeket a tüneteket is okozhatja a gyenge floém működés, mivel ennek következtében, sem megfelelő mennyiségű tápanyag, sem a normális fejlődéshez szükséges növekedési hormon nem jut el az azt igénylő szövetekhez.

Megfigyelték a keményítő tartalom változását is. Míg a gyökerek floémében csökkent a keményítő mennyisége -feltehetőleg a gátolt floém működés következtében-, addig a föld feletti részek floémében az oldható szénhidrátok és keményítő felhalmozódását tapasztalták (Catlin *et al.*, 1975; Douglas, 1993). Az oldható és oldhatatlan nitrogén szállítása (aminosavak) szignifikáns mértékben nem volt gátolt (Lepka *et al.*, 1999).

Néhány tanulmányban a kóros elváltozások és a növények hormonszintje közti összefüggéseket vizsgálták. Gáborjányi és Sziráki (1978) CPh fertőzött fehér here növények citokinin szintjének változását vizsgálták. Megállapították, hogy az ellevelesedett virágok összes citokinin szintje szignifikánsan megnövekedett. Mások azt találták, hogy a kinetin kezelés vissza tudja szorítani a tüneteket a sztolburos paradicsomban (Ulrichova and Petru, 1975). Ezt alátámasztották Pertoték (1998) kísérletei is; ahol a fitoplazmák száma valóban nem növekedett, de a kezelés befejezését követően a tünetek újra erősödtek. Tehát a fitoplazmák épen maradtak a magas hormonszint mellett is. A fertőzött növényekben kilencszeres indol-ecetsav növekedést tapasztaltak, ezért a továbbiakban megvizsgálták, hogy vajon csak az auxin szint növelésével elő lehet-e idézni a fitoplazma okozta tüneteket. Hasonlóan Shepardson-ék eredményeihez (Shepardson and McCrum, 1979) a fitoplazma okozta sárguláshoz hasonló tüneteket ki tudtak váltani egészséges rózsameténg növényeken, ellenben a fertőzött növényeken megfigyelt tünet együttest semmilyen koncentrációval és hormonfeleséggel nem lehetett létrehozni. Tehát nemcsak a hormonegyensúly felborulása a felelős az elváltozásokért (Pertot *et al.*, 1998). A hormonszint megváltozásának egyik lehetséges oka a fitoplazma saját hormontermelése, illetve a fertőzés hatására bekövetkező anyagcserezavarok fellépése. Ez utóbbi feltételezést támasztja alá Parthasarathy (1974), aki fiatal, fitoplazma fertőzött levelekben nagyon alacsony indol-ecetsav-oxidáz aktivitást talált, aminek következtében az auxin mennyisége hasonlóan Schneider 1977-ben tett megfigyeléseihez jelentősen megnőtt. Másik lehetséges ok a fitoplazma által termelt, ma még fel nem derített természetű toxin jelenléte a fertőzött szövetekben, illetve növényekben. Több kísérlet szerint a tünetek olyan szövetekben is előfordultak, amelyben nem találtak fitoplazmát. Ez arra utal, hogy valamilyen toxikus anyag, (amit vagy a fitoplazma, vagy a gazdanövény a fitoplazma jelenlétére adott válaszreakció során termelt) szétáramlott a növényben (Braun and Sinclair, 1976; Eden-Green, 1976, 1979; Parthasarathy, 1974).

Schneider 1977-ben nyomon követte a fitoplazma fertőzés hatására a floémában bekövetkező változásokat. Azt tapasztalta, hogy a szövetek nekrotikus elhalását a kambium hiperaktivitása, valamint nagy mennyiségű keményítő és polifenol felhalmozódás előzte meg. A nekrosis az összeeső sejtekből kiszabaduló polifenolok oxidációjának következményeként történhetett (Schneider, 1977, Douglas, 1993). Ezt a feltevést támasztja alá Guthrie (2001) megfigyelése, mely szerint a "papaya dieback" olyan hirtelen pusztítja el a növényt, hogy az nem tulajdonítható csupán a floém és a xylém csökkent működésének, hanem valószínűleg valamilyen toxikus anyag szétterjedésének hatására történhet.

Jelentős változásokat figyeltek meg a fertőzött papaya növények fotoszintézisében, légzésében és a sztómák működésében is. Már a fitoplazmás növények felső, de még tünetmentes leveleiben is szignifikánsan csökkentek az említett funkciók. A szimptómák megjelenését követően szinte alig volt fotoszintetikus aktivitás, a sztómák folyamatosan zártak voltak. A sztómák zártsága magával vonta a CO<sub>2</sub> elérhető mennyiségének csökkenését, a levelek hőmérsékletének emelkedését is (amely már magában csökkenti a fotoszintetikus kapacitást), valamint a xylém transzport csökkenését is (Guthrie *et al.*, 2001).

## 2.5. A fitoplazmák kimutatása és azonosítása

A fitoplazmák kimutatása az utóbbi évtizedekben áttevődött a korábban használt közvetlen módszerekről (elektron- és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok, átviteli kísérletek, a kórokozó visszaszorítása tetraciklin kezeléssel) a közvetett, molekuláris genetikai és immunmódszerek alkalmazására, mert ezek az eljárások sokkal érzékenyebbek, és a fitoplazma izolátumoknak a megfelelő rendszertani csoportba történő besorolására is alkalmasak.

1967-ben új növényi kórokozókat (a viroidokat és a fitoplazmákat) különítették el (Diener and Raymer, 1967; Doi *et al.* 1967), sárgulós tüneteket mutató növények szöveteiben. A felfedezés vizsgálatok sorozatát indította el, amelynek köszönhetően számos növényi betegségről kiderült, hogy ellentétben a korábbi feltételezésekkel, a tüneteket nem vírus, hanem viroid, vagy fitoplazma fertőzés okozza. (Doi *et al.*, 1967; Nasu *et al.*, 1967; Granados *et al.*, 1968; Maramorosch *et al.*, 1968). A következő években, több esetben mikoplazmához hasonló egysejtűeket találtak elektronmikroszkóppal sárgulós, törpülési és seprősödési tüneteket mutató növény floémában, és egyes rovarfajok egyedeiben (Ploaie, 1971; Casper 1969; Shikata *et al.*, 1969; Maramorosch 1974, 1976, 1979; Horváth 1970; Whitcomb and Davis 1970). Az elektronmikroszkópos vizsgálatokat hosszútávon viszont csak kimutatásra

használni igen költséges és időigényes eljárásnak bizonyult, ugyanakkor nagyon sok adatot lehetett szerezni a fitoplazmák felépítéséről, és a növényi szövetekben megfigyelhető elváltozásokról. (2.2. fejezet). Közvetlen módszerként használtak még a felhalmozódott kallóz megfestésére fénymikroszkópos kimutatáshoz Resorcin-kék festéket (Braun and Sinclair, 1976), fluoreszcens mikroszkóphoz pedig anilin kék festéket (Seemüller, 1976).

1976-ban Erich Seemüller (1976) kifejlesztett egy új, DAPI festéses eljárást, amellyel a beteg növények szöveteiben már 550-szeres nagyításnál is láthatók a fitoplazmák DNS/RNS állománya fluoreszcens fényben. Az eljárás jelentősen egyszerűbb, idő- és költségkímélőbb az elektronmikroszkópos vizsgálatnál. Érzékenység szempontjából viszont ez is elmarad a közvetlen módszerektől (Malinowski *et al.*, 1996). Douglas (1986) ötvözte a DAPI festéses és az elektronmikroszkópos eljárást, amelynek segítségével pontosan nyomon tudta követni a fitoplazmák szezonális eloszlását őszibarack fában.

A 60-as évek végén Gáborjányi és Bencsics (1968) antiszérumot készítettek a sztolbur fitoplazma ellen. A fertőzött burgonya és paradicsom szöveteiből egyértelműen ki tudták mutatni a kórokozó jelenlétét. A 80-as években közvetett, immunfluoreszcens tesztek dolgoztak ki. Ennek alkalmazásával *in situ* tudták azonosítani a fitoplazmákat poli- és monoklonális antitestekkel (DaRocha *et al.*, 1986; Lin and Chen, 1986; Hiruki, 1988 Jiang *et al.*, 1989). Ezt a módszert elsődlegesen lágyszárú növényeknél alkalmazták. A fitoplazmák közvetlen kimutatásához érzékeny módszernek bizonyult még az immunoszorbens elektronmikroszkópos eljárás is, amelynél immun-arany jelölést használtak (Mouches *et al.*, 1983; Hiruki, 1988).

Nagy előrelépést jelentett a Kollar és munkatárai által 1989-ben kifejlesztett DNS elválasztási módszer, amellyel tökéletesen el tudták különíteni a fitoplazma DNS-ét a növényi DNS-től (Kollar *et al.*, 1990). Az eljárás segítségével már fitoplazma DNS próbákat lehetett készíteni, így dot blot és southern blot módszerrel a kórokozó jelenlétét lehetett kimutatni. Bár eleinte az említett módszereket többen alkalmazták fitoplazmák kimutatására (Bonnet *et al.*, 1990; Harrison *et al.*, 1992), valamint az egyes csoportok elkülönítésére (Kirkpatrick *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992; Ahrens *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993), a PCR technika megjelenése ezeket rövid időn belül felváltotta. Az eljárást sikerrel alkalmazták más baktériumok (pl. mikoplazmák) kimutatására (Bernet *et al.*, 1989; Harasawa *et al.*, 1990; 1991). Abban az időben még nagyon kevés információval rendelkeztek a fitoplazmákról, a konzervatív 16S rDNS szakaszra tervezték az első univerzális primereket (Ahrens and Seemüller, 1992). Később számos univerzális és specifikus primert terveztek a 16S és 23S rDNS-re, amit sikeresen fel is használtak a kórokozók kimutatására, és egyes esetekben az azonosításra is

(Schneider *et al.*, 1993; Namba *et al.*, 1993; Kirkpatrick *et al.*, 1994; Jarausch *et al.*, 1994; Maixner *et al.*, 1995; Harrison, 1996;; Griffiths *et al.*, 1994,1999; Gundersen *et al.*, 1996; Marcone *et al.*, 1997). A PCR termékeket a továbbiakban restrikciós endonukleázokkal hasítva, az egyes fitoplazma csoportokat azonosítani lehetett, valamint elkezdődhetett a módszer segítségével az osztályozás alapjainak letétele (Lee *et al.*, 1993).

## 2.6. A fitoplazmák fenntartása

A fitoplazmákat nem tudjuk táptalajon tenyészteni. Számos próbálkozás történt a megfelelő táptalaj összetételének meghatározására (Jones *et al.*, 1977; Müller *et al.*, 1975; Elmendorf, 1977; Whitcomb and Tully, 1979). Kollar és munkatársai (1989, 1990) meghatározták az AP fertőzött almafa floém nedvének alkotóelemeit, hogy az eredmények alapján összeállítsák a megfelelő táptalajt. A rostacsövekben uralkodó körülményeket (nedv összetétel, nyomás, hőmérséklet, különböző alakú tenyésztedények, hormonok, vitaminok, amino- és nukleinsavak, lipidek stb.) több laboratóriumban is megpróbálták mesterségesen létrehozni (Report Prepared for the MLO Culture Session 9th International Congress of the IOM, Ames, 1992), de máig nem létezik olyan táptalaj, amelyen 72 óránál tovább életben maradnának a sejtek, illetve szaporodásnak indulnának.

Az élő növényben való fenntartás jelenleg nem kerülhető el. Erre egyes lágyszárú növényeket használnak (*Nicotiana tabacum*, *Catharanthus roseus*), mert ezekben magas koncentrációban vannak jelen a fitoplazmák, ami megkönnyíti a velük való munkát, továbbá ezeket a növényeket könnyebb oltani, mint a fásszárúakat. A növényeket üvegházi körülmények között tartva egész évben egyenletes növényanyag ellátást kapunk.

A fitoplazmák *in vitro* fertőzött növényben történő fenntartásával több növényfaj (kankalin, nyárfa, krizantém, gladiólusz, hortenzia, eper, rózsameténg, tojásgyümölcs és szilvafa) esetében is megpróbálkoztak (Sears and Klomparens, 1989; Cousin *et al.*, 1990; Bertaccini *et al.*, 1992; Bhansali and Ramawat, 1993). Ezzel a fenntartási módszerrel folyamatos és egységes vizsgálati anyagot lehet biztosítani, illetve kimutatták, hogy a több éven keresztül így fenntartott növényekben a kórokozó koncentrációja növekedett. (Jarausch *et al.*, 1994). Előnyként kell még megemlíteni, hogy az *in vitro* tartott növények szövetei sokkal lágyabbak, ami jelentősen könnyíti a DNS kivonást. A módszer hátránya, hogy a növények gyengén növekednek, így nem lehetett olyan tömegű növényanyagot kapni, amellyel hosszútávon dolgozni lehet.

## 2.7. A fitoplazmák elleni védekezés

A kórokozó egyaránt fertőz rost- és lombos növényeket, gyümölcs- és erdei fákat, valamint dísznövényeket (McCoy *et al.*, 1989; Marwitz, 1990; Sinclair *et al.*, 1996). A felsorolásból kitűnik, hogy a fitoplazmák széles körben elterjedtek, súlyos tüneteket, valamint nagy gazdasági károkat (termés veszteség, minőségi romlás, dísznövényeknél erős küllemi elváltozás) tudnak okozni, így nagyon fontos kérdés az ellenük való védekezés.

Kezdetben a beteg növények gyógyítását antibiotikum kezeléssel próbálták megoldani. Többféle antibiotikumot kipróbáltak. Tetraciklin származékokkal sikerült visszaszorítani a kórokozók számát, ellenben a kezelés végeztével a fitoplazmák újra felszaporodtak. A penicillin-származékok semmilyen hatással nem voltak (Kuroli, 1970a; Douglas, 1993). Az antibiotikum kezeléssel kizárólag kísérleti szinten foglalkoztak, és foglalkoznak.

A növények fitoplazmáktól történő mentesítésének másik lehetséges módja, hasonlóan egyes baktériumokéhoz, a hőkezelés. A vegetatív részek hőkezelésével azonban óvatosan kell bánni, nehogy csökkenjen az életképességük (maximum 50°C-os vízfürdő). Általában 30-37°C-os kezelést alkalmaznak több héten, vagy hónapon keresztül. Az időtartam a fitoplazmák koncentrációjától függ a beteg növények szöveteiben (Salazar, 2001).

Az esetek túlnyomó részében a fent említett kezelések nem alkalmazhatók. Jelenleg annyit tehetünk, hogy a beteg növényeket eltávolítjuk és ezzel a fitoplazmák terjedését meggátoljuk. Az eltávolítás rendkívül agresszív beavatkozás, főleg a gyümölcs- és erdei fák esetében, hiszen néha évtizedes munka és anyagi ráfordítás semmisül meg. Így leginkább a megelőzésre kell nagy figyelmet fordítani. Kizárólag ellenőrzött oltóanyagot lenne szabad használni. Fontos szerep hárul e tekintetben is a növényvédelemre, hiszen a kabócák számának csökkentésével a fitoplazma terjedését is gátoljuk.

## 2.8. Fitoplazma-körkép Magyarországon az ezredfordulóig

Magyarországon az első, még vírusként azonosított sztolbur fitoplazmát Szirmai János írta le 1956-ban paprikán, burgonyán, paradicsomon, dohányon és csattanó maszlagon. Később mások is igazolták a sztolbur fitoplazma jelenlétét hazánkban: Petróczy dohányon 1958-ban és burgonyán 1962-ben, Gáborjányi és Lönhárd paradicsomon, paprikán, burgonyán és dohányon 1967-ben, valamint Horváth ezeken kívül egy új gazdanövényen, a repcén 1969-ben (amit akkor még here törpülés mikoplazmaként határozott meg). Kuroli 1970-ben (1970b) szoros összefüggést állapított meg a sárgalábú recéskabóca (*Hyalesthes obsoletus*) és a sztolburfertőzöttség között.

Rainiss 1961-ben fehérherén egy hazánkban még új, de a külföldi irodalomban már ismert mikoplazmás betegséget talált, amelynek kórokozóját akkor a "here virágzöldülés" (Clover Phyllody - CPh) fitoplazmával azonosította. Mai eredményeink tükrében, az akkor leírt fitoplazma nagy valószínűséggel a sztolbur volt.

Az 1990-es években Szendrey és munkatársai (1996) elkezdtek felmérni a fitoplazma fertőzés helyzetét a hazai szőlőültetvényekben. A vizsgálatok alapját a hazánkban megfigyelt és a külföldi irodalomban leírt tünetek hasonlósága szolgáltatta. A sztolbur fitoplazmát sikerült kimutatniuk a fehér és vörös fajtáknál egyaránt.

Süle és munkatársai 1992-ben észlelték először a csonthéjasok európai sárgulása fitoplazmát (ESFY) kajszin (nem közölt adat). Később több kajszi ültetvényben felfigyeltek a fák tömeges pusztulására, valamint mandulafán is találtak fitoplazma fertőzöttségre utaló jeleket. A betegség tüneteit mutató fák nagy részéből ki tudták mutatni az ESFY fitoplazma jelenlétét (Süle *et al.*, 1997; Viczián *et al.*, 1997). Ugyancsak Süle és munkatársai számos zöldség- és gyomnövényen azonosították a sztolburt (Viczián *et al.*, 1998), 5 káposztafajon az őszirózsa sárgulás fitoplazmát (AAY) (Fodor *et al.*, 1999), valamint fehérherén a herevirág elleveledése fitoplazmát (nem közölt eredmény).

1998-ban egy dél-magyarországi magtermő törzsültetvény tesztelése során Németh és munkatársai (2000) az őszibarack fitoplazmás betegségére figyeltek fel. Ugyancsak ebben az évben fitoplazmás sajmeggy fákat találtak a hazai csonthéjasok génbanki állományában (Varga, 2001). Némethy több gyom- és dísznövényen azonosított fitoplazma fertőzést (2001).

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Növényi anyagok

##### Standard fitoplazma csoportok

A pozitív kontrollként használt fitoplazma csoportok (AAY-American Aster Yellow-őszirózsa sárgulás; ESFY-European Stone Fruit Yellows; AP-Apple Proliferation-almafa boszorkányseprűsödés és STO-sztołbur) DNS mintáit Dr. E. Seemüllernél (BBA, Dossenheim, Németország) vontuk ki, majd hazahoztuk. A fitoplazmákat rózsameténg és dohány növényekben oltással tartottuk fenn.

##### Vizsgált növényi minták

A mintákat az ország több pontjáról gyűjtöttük, illetve kaptuk. A saját gyűjtéseken kívül alma és káposzta mintákat Dr. Mozsár Józseftől (Singenta, Ócsa); paprika, paradicsom, dohány, mandula és egyes gyomnövényeket Dr. Gáborjáni Richardtól (Veszprémi Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Keszthely), cseresznyét Mergenthaler Emesétől (Magyar Tudományos Akadémia, Növényvédelmi Kutatóintézete, Budapest), kajszi mintákat Nagy Gézától (Sóskút, Fruct KFT), és százszorszépet dr. Némethy Zsuzsától (Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Budapest) kaptunk.

#### 3.2. Fitoplazmák fenntartása

A standard fitoplazma csoportokat rózsameténg és dohány növényekben átoltással tartottuk fenn. A fertőzött növények 4-6 leveles hajtáscsúcsait levágtuk. A két felső levelet meghagytuk, a többi lecsíptük és a szárát, ék alakúra faragtuk. Kiválasztottunk egy hasonló vastagságú ágat az egészséges növényen, a hajtásvéget eltávolítottuk, szárát bevágtuk, az oltandó részt beillesztettük, és parafilmmel rögzítettük. A növényeket páradús környezetben, lefedve tartottuk, amíg az oltott hajtás növekedésnek nem indult, majd a végleges helyre tettük.

A hazánkban talált sztołbuos paradicsomot további kísérletekhez ugyanígy, átoltással tartottuk fenn, az előbbieken leírt módszert alkalmazva.

#### 3.3. A fitoplazma fertőzés kimutatására alkalmazott módszerek

##### 3.3.1. Epifluoreszcens kimutatási módszer -DAPI teszt

(Seemüller E., 1976)

A növényi minták 0.5 cm átmérőjű ágak voltak. Ezekből 1 cm-es darabokat vágunk le és 5%

glutáraldehid tartalmú, 7.0 pH-jú 0.1M-os kálium-foszfát pufferben tároltuk. Hűtött vágóélű mikrotommal különböző vastagságú szeleteket vágunk le belőlük, amelyeket tárgylemezre helyeztük. 1µg/ml DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) tartalmú, 7.0 pH-jú 0.1M kálium-foszfát puffert cseppentettünk rá, majd fedőlemezt helyeztünk rá. Két perc elteltével a felesleges festéket szűrőpapírral kiszívattuk. A mintákat 500-630-szoros nagyítással, 365 nm-es hullámhosszú fényben, és 410 nm-es szűrővel vizsgáltuk.

### **3.3.2. Kimutatás és meghatározás molekuláris biológiai módszerekkel**

#### **3.3.2.1. DNS kivonás**

##### **“Doyle and Doyle” kivonási módszer**

(Doyle and Doyle, 1990)

1. A “Doyle and Doyle” oldatot (összetétel az alábbiak szerint) előmelegítettük 60°C-ra (minden növényi mintához 1ml-t);
2. 0.5 g növényi eret, vagy floemet kis dörzsmozsárba tettünk és az előmelegített oldattal homogénre dörzsöltük;
3. a homogenizátumokat 30 percig 60°C-os vízfürdőben tartottuk;
4. a törmeléket rövid, gyors centrifugálással leüleptítettük, és a felülúszót tiszta csőbe tettük;
5. azonos mennyiségű kloroform/izoamilalkohol keverékével (24/1 v/v) összeráztuk, majd 5 percig 6000 g-n centrifugáltuk;
6. a felső fázist óvatosan leszívtuk, áttettük tiszta csőbe és 2/3-ad mennyiségű -20°C-os izopropanol hozzáadásával kicsaptuk a DNS-t, jól összeráztuk, és 5 percig 4°C-on 12000 rpm-en (asztali centrifugában) üleptítettük;
7. az üledéket 70%-os etanollal mostuk, 5 percig 4°C-on 12000 rpm-en (asztali centrifugában) üleptítettük;
8. az üledéket beszárítottuk és 50µl desztillált vízben feloldottuk;
9. a DNS oldatot -20°C-on tároltuk.

##### **“Doyle and Doyle” kivonó oldat**

12.5 g CTAB (hexadeciltrimetilammónium bromid); 140ml 5M NaCl (40.98 g); 20ml 0.5M EDTA (3.722 g); 50ml 1M TRIS [tris (hidroximetil) aminometán] pH 8 (6.05 g); 5 g PVP-40 (polivinilpolipirrolidon);

500ml-re kiegészítettük desztillált vízzel és a pH-t 8.0-ra beállítottuk;

közvetlenül használat előtt merkaptóetanolt adtunk hozzá (1ml-t 500ml oldathoz).



### **“Delladoyle” kivonási módszer**

(Ahrens és Seemüller, 1992)

1. A dörzsmozsarakat 5%-os sósavban 20 percen keresztül áztattuk, majd desztillált vízzel kiöblítettük, jégen tartottuk;
2. elkészítettük az egyszeres “Dellaporta” homogenizáló oldatot és azt is jégen tartottuk;
3. 0.5-1 g tömegű növényi anyagot feldaraboltunk, 7ml oldatba tettük, állni hagytuk 10 percre;
4. gondosan szétdörzsöltük;
5. újabb 6ml oldatot adtunk hozzá és tovább dörzsöltük, amíg teljesen homogén nem lett;
6. a homogenizált anyagot centrifuga csőbe öntöttük, és 4°C-ra előhűtött centrifugában 1000 g-n 4 percre centrifugáltuk;
7. a felülúszót tiszta csőbe átöntöttük, vigyázva, hogy ne keveredjen fel az üledék;
8. 4°C-ra előhűtött centrifugában 16000 g-n 25 percre centrifugáltuk;
9. az üledéket 1.5ml 60°C-ra előmelegített “Doyle and Doyle” oldatban szuszpendáltuk és további 30 percre 60°C-on tartottuk oldódni;
10. a feloldódott sejteket két 1.5ml-es Eppendorf csőbe szétosztottuk és azonos mennyiségű kloroform/izoamilalkohol oldatot (24:1 v/v) adtunk hozzá, jól összeráztuk, majd 6000 g-n 5 percre centrifugáltuk;
11. a felső fázist tiszta csőbe tettük, nagyon óvatosan, hogy a fázisok ne keveredjenek; 2/3 mennyiségű -20°C-os izopropánolt adtunk hozzá, összeráztuk és 5 percre 12000 rpm-en centrifugáltuk asztali centrifugában;
12. az üledéket 70%-os etanollal mostuk, majd 5 percre 12000 rpm-en centrifugáltuk;
13. az üledéket beszárítottuk, majd 100µl steril desztillált vízben feloldottuk;
14. a DNS mintákat -20°C-on tároltuk.

### **“Dellaporta” oldat**

1x Dellaporta oldat: 1/1 arányban desztillált víz és 2x Dellaporta oldat, aszkorbinsav (0.53 g/100ml) , pH 7.6.

### **2x Dellaporta oldat**

21.7 g  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ; 4.1 g  $KH_2PO_4$ ; 100 g szacharóz; 1.5 g BSA (marha szérum albumin);  
20 g PVP-10;  
500ml-re kiegészítve desztillált vízzel.

### DNS kivonási módszer csonthéjas növényekből

(Bahnweg *et al.*1998)

1. 150-200 mg mintát folyékony nitrogénben szétőrzsöltünk, majd 100 mg mennyiséghez 1ml-t adtunk a következő elegyből: metanol 50% (v/v)+50µl 20% (w/v) CaCl<sub>2</sub>+1% (w/v) β-merkaptoetanol;
2. jégen tartottuk 10 percig, időnként felráztuk, majd 10 percig 4°C-on 15000 g-n centrifugáltuk;
3. megismételtük a metanol/CaCl<sub>2</sub> kezelést, majd még egyszer CaCl<sub>2</sub> nélkül;
4. az üledékhez 400µl benzil-kloridot és 500µl kivonó oldatot [100mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 2% (w/v) CTAB, pH 8.0 és közvetlenül használat előtt 1%(w/v) β-merkaptoetanol és 2% (w/v) PVP] adtunk;
5. 10 percig 4°C-on kevertük, majd hozzáadtunk 300µl kloroformot (-20°C) és 100µl *Nucleon PhytoPure* gyantát (Amersham) és további 5 percig kevertük 4°C-on, majd 10 percig 4°C-on 1500 g-n centrifugáltuk;
6. a felülúszót áttettük 300µl kloroformot és 100µl *Nucleon PhytoPure* gyantát tartalmazó tiszta csőbe, 5 percig 4°C-on tartottuk és 10 percig 4°C-on 1500 g-n centrifugáltuk;
7. 400µl felülúszót óvatosan áttettünk új csőbe és hozzáadtunk 200µl izopropanolt, közben jégen tartottuk, összeráztuk és 10 percig jégen tartottuk; 10 percig 4°C-on 15000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót leöntöttük;
8. az üledéket 5 percig 1ml szobahőmérsékletű 70% etanol/0.1M Na-acetát keverékével mostuk, ezt követően 80% etanollal, majd 1ml 100% etanollal és végül 1ml kloroformmal mostuk, szobahőmérsékleten centrifugáltuk;
9. a csöveket 30 percig szobahőmérsékleten beszárítottuk, majd visszaoldottuk a DNS-t 100µl TE (pH 8.0) oldatban.

### DNS tisztítás céziumklorid-etídium bromidos (CsCl-EtBr) módszerrel

1. Növényekből a “Doyle and Doyle” kivonási módszerrel DNS-t tisztítottunk;
2. a DNS üledéket 10ml desztillált vízben oldottuk vissza a kicsapás után és milliliterenként 1 g CsCl-t adtunk hozzá;
3. 800µl EtBr oldatot (10 mg/ml) adtunk hozzá, összeráztuk, majd beállítottuk az oldat törésmutatóját 1.38-ra (1.55 g/ml);
4. az oldatot 5 percig szobahőmérsékleten 8000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót egy 10ml-es csőbe (Beckman, Quick-Seal) áttöltöttük és leforrasztottuk;

5. a mintákat 48 órán keresztül centrifugáltuk 20°C-on 45000 rpm-en;
6. leállítás után UV fényben a csíkba rendeződött DNS-t egy injekciós tűvel leszívtuk, mentesítettük a CsCl-től és EtBr-tól (Sambrook *et al.* 1989).

### 3.3.2.2. Dot blot - hibridizálás

**(Boeringer Mannheim Biochemica, DIG Nucleic Acid detection Kit)**

#### Próba DNS előkészítése

A jelölendő próba DNS-t (AP fitoplazma fP1/rP7 primerekkel felszaporított termékének részlegesen emésztett ~100 bp nagyságú DNS szakasza; Dr. Michael Bergtől, BBA Dossenheim, Németország) a pUC18 plazmidban tartottuk fenn és szaporítottuk. A próba a Hind III restrikciós vágó helyen található.

A blottoláshoz először linearizáltuk a plazmid DNS-t. A plazmidot EcoRI restrikciós enzimmal vágtuk és fenol/kloroformos tisztítási módszerrel mentesítettük az enzim maradékától.

#### Próba DNS jelölése digoxigeninnel (DIG)

1. 10 ng - 3 µg lineáris próba és kontroll DNS-t denaturáltunk forró vízben (100°C) 10 percre, utána rögtön jégre raktuk;
2. 1 µg frissen denaturált DNS-t, 2 µl hexanukleotid keveréket, 2 µl dNTP jelölő keveréket összekevertünk, az oldatot kiegészítettük desztillált vízzel 19 µl-re, és 1 µl Klenow enzimet adtunk hozzá (Fermentas);
3. fél percre centrifugáltuk, majd éjszakán át 37°C-on inkubáltuk;
4. a reakciót 2 µl 0.2M EDTA (pH 8.0) hozzáadásával leállítottuk;
5. a jelölt DNS-t 2.5 µl 4M LiCl-dal és 75 µl -20°C-os vízmentes etanollal 30 percre át -70°C-on kicsaptuk;
6. a DNS csapadékot 70% alkohollal kétszer mostuk.

#### Dot blot - hibridizálás

1. Nitrocellulóz membránt (NC-45 SERVA) előáztattunk steril desztillált vízben, majd

- 20xSSC-ben (Saline nátrium citrát puffer) 5 percig áztattuk; használat előtt 20 percen keresztül két szűrőpapír között préselve szárítottuk;
2. a vizsgálandó DNS-ből hígítási sort készítettünk (10 pg/μl-10fg/μl) és a kontroll DNS-sel együtt denaturáltuk, majd azonnal jégre tettük;
  3. az így kapott egyszálú DNS-ekből 1μl-t membránra cseppentettünk;
  4. a DNS-t 3 percig UV transzilluminátorban rögzítettük;
  5. zárt edényben előhibridizáltattuk 100 cm<sup>2</sup> filterenként 20ml hibridizációs oldattal, 68°C-on, minimum 1 órán át;
  6. 100 cm<sup>2</sup> filterenként 2.5ml; 100 ng/ml frissen denaturált próba DNS-t tartalmazó hibridizációs oldatot adtunk hozzá, és 68°C-on minimum 6 órán át inkubáltuk;
  7. kétszer mostuk 5 percig 25 °C-on 50ml 0.1% SDS (nátrium dodecil szulfát) tartalmú 2xSSC-ben és kétszer 15 percig 68°C-on 50ml 0.1% SSC, 0.1% SDS-ben;
  8. a továbbiakban a membránt nedvesen, és levegőn szárítva is lehet használni;
  9. a jelölt hibridizáló oldatot -20°C-on tárolni lehet, és többször fel lehet használni.

Hibridizációs oldat: 5xSSC

1% blokkoló oldat

0.1% N-laurylsarcosine

0.02% SDS

20xSSC:

3M NaCl, 0.3M Na-citrát pH 7.0

### **Kimutatás**

1. A nitrocellulóz membránt egy percig mostuk az 1. oldatban;
2. 30 percig 100ml 2. oldatban inkubáltuk 25°C-on;
3. az antitestet a 2. oldatban 5000-szeresére hígítottuk;
4. a membránt 30 percig 20ml hígított antitest oldatban inkubáltuk;
5. a nem kötődött antitesteket kétszer 15 percig 100ml 1. oldattal kimostuk;
6. a membránt 2 percig mostuk 20ml 3. oldatban;
7. sötétben, zárt dobozban körülbelül 16 órán át, rázatás nélkül festettük, 10ml festék oldatban;
8. a reakciót leállítottuk a 4. oldat hozzáadásával
9. a membránt 25 °C-on megszárazítottuk.

- 1.oldat: 0.1M maleinsav, 0.15M NaCl (pH 7.5) autoklávozva  
 2.oldat: 10x higított blokkoló oldat az 1.oldattal  
 3.oldat: 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9.5)  
 4.oldat: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)  
 festék oldat: 45μl NBT oldat, 35μl “X”-foszfát puffer, 10ml 3. oldatban

### 3.3.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR, polymerase chain reaction)

#### PCR reakció

A PCR-hez univerzális (fU5/rU3 és fP1/rP7, Kirkpatrick *et al.* 1994) és specifikus (fSTOL/rSTOLS, Maixner *et al.* 1995, fO1/rO1 fAT/rAS, Kirkpatrick *et al.* 1994 1.táblázat) indítószekvenciákat használtunk.

1.táblázat: A fitoplazmák kimutatására és azonosítására felhasznált primerek

Primer neve és iránya	Cél DNS	Szekvencia (5'-3')	Pozíció (bp)
fP1	16S/23S spacer	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A	6-28
fO1	16S rDNS	CGG AAA CTT TTA GTT TCA GT	61-81
fU5	16S rDNS	CGG CAA TGG AGG AAA CT	370-387
fAT	16S rDNS	CAT CAT TTA GTT GGG CAC TT	1115-1135
fSTOL	16S rDNS	GCC ATC ATT AAG TTG GGG A	1116-1133
rO1	16S rDNS	AAG TGC CCA ACT AAA TGA T	1115-1135
rU3	16S rDNS	TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA	1230-1250
rAS	16S/23S spacer	GGC CCC GGA CCA TTA TTT ATT	1598-1619
rSTOLS	16S/23S spacer	AGA TGT GAC CTA TTT TGG TGG	1709-1737
rP7	16S/23S spacer	TTC TCG GCT ACT TCC TGC	1818-1836

A reakcióelegy a következő összetevőkből állt: 0.2μM mindkét primerből, 100μM dNTP, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2-1 egység Taq polimeráz és 2-15μl DNS oldat.

Az 500-1100 bp fitoplazma DNS fragmenteket 35 ciklusban szaporítottuk fel a következő paraméterek mellett: 94°C 1 percig (denaturáció), 55°C 1 percig (annealing), 72°C 1 percig (elongáció) és végül 72°C 7 percig a már elkezdődött szintézisek befejezéséhez. Az 1100 bp-nál nagyobb szakaszok esetében 1.5 perces elongációs időt alkalmaztunk. A reakciókhoz a PDR 91 (BLS) és a PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research) készülékeket használtuk fel.

### **Nested PCR**

Az eljárás két egymást követő szaporítási szakaszból áll, amely során először a nagyobb szakaszt szaporítjuk fel, és ezt használjuk minta DNS-ként a második szakaszban. Az első szaporításhoz egy univerzális primer párt használunk, míg a másodikhoz olyan primereket, amelyek az univerzális primerek által felszaporított részen belül helyezkednek el. Ez a módszer a kimutatás érzékenységét jelentősen növeli.

A reakciókat ugyanazokkal a paraméterekkel végeztük el, mint az egyszerű PCR esetében. A második PCR-hez az első reakcióelegyből különböző mennyiségeket tettünk.

#### **3.3.2.4. Restrikciós fragment analízis (RFLP, restriction fragment length polymorphism)**

A növényeket fertőző fitoplazma csoport azonosítását RFLP módszerrel végeztük. Ennek során a PCR során pozitívnak mutatózó minták PCR termékét vágtuk restrikciós endonukleázokkal, majd poliakrilamid gélen a kapott darabokat elválasztottuk.

A reakcióelegy a következőket tartalmazta: 20 $\mu$ l a PCR elegyből; 2.2 $\mu$ l 10x restrikciós endonukleáz puffer; 5 egység restrikciós endonukleáz. Az elegyet éjszakán át inkubáltuk az enzim működésének megfelelő hőmérsékleten (jelen esetben 37°C-on). Ezt követően az enzimet inaktiváltuk (10 percig 65°C-on), majd 12%-os poliakrilamid gélen a különböző méretű szakaszokat elválasztottuk (Sambrook, 1989).

### **3.4. Immunológiai eljárások**

#### **3.4.1. Fehérje tisztítás**

##### **Fehérje tisztítás rózsameténgből**

1. 25-30 g levelet és szárat 1 órán át folyóvízben mostunk;
2. folyékony nitrogénben vagy -80°C hűtés után elporítottunk, és ötszörös mennyiségű kivonó oldatot (250mM TRIS, 137mM NaCl<sub>2</sub>, 30mM aszkorbinsav: pH 8.2) tettünk rá;
3. hűtött homokkal homogénre dörzsöltük;
4. 5 réteg gézen átszűrtük;
5. 6000 g-n 1 órán át 4°C-on centrifugáltuk;
6. a felülúszót 70000 g-n 40 percig 6°C-on centrifugáltuk;
7. az üledéket GM oldatban (0.3M glicin, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M NaCl<sub>2</sub>, 5% szacharóz, pH 8.0) szuszpendáltuk.

### **Fehérje tisztítás dohányból – fitoplazma koncentráció eljárással**

Uli Lauer (BBA, Dossenheim) szóbeli közlése szerint.

1. A dohány szárát alkohollal lemostuk, hogy ne ragadjon;
2. hosszanti irányban éles pengével bevágtuk a szárát, a kambiumig felhúztuk a szövetet (mintegy meghámoztuk);
3. a lehúzott rész belső oldaláról vékony rétegben leválasztottuk a floemet (selymesen csillogó réteg);
4. a lehámozott réteget azonnal oldatba tettük;
5. a fehérje kivonást a fent leírt módon végeztük el.

### **3.4.2. Immunoblot**

(Undigested Lambda ZAP II Cloning Kit, Stratagene)

#### **3.4.2.1. Fág könyvtár titrálása**

1. 50ml LB (Luria-Bertani) táptalajban (1 literre: 10 g tripton, 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl; pH 7.0) 0.2% (v/v) maltózzal és 10mM MgSO<sub>4</sub>-tal kiegészítve szaporítottuk az *E.coli* XL1-Blue MRF baktériumot éjszakán át 30°C-on;
2. 10 percig 2500 g-n leüleptítettük a sejteket;
3. az üledéket 15ml 10mM MgSO<sub>4</sub>-ben szuszpendáltuk, majd az optikai denzitást (OD) 600 nm-en beállítottuk 0.5-re (10mM MgSO<sub>4</sub> felhasználásával);
4. a fág szuszpenzióból hígítási sort készítettünk SM oldatban [1000ml-ben: 5.8 g NaCl, 2.0 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50ml 1M Tris-HCl (pH 7.5), 5ml 2%(w/v) zselatin], majd mindegyikhez 200µl baktérium szuszpenziót adtunk és 15 percig 37°C-on együtt tartottuk őket;
5. mindegyik fág-baktérium keverékhez 3ml 48°C-os fedőagart adtunk (LB táptalaj 0.7% (w/v) agaróz) és a már előzőleg Petri csészékbe kiöntött LB táptalajra öntöttük;
6. a Petri csészéket 37°C-on tartottuk éjszakán át, majd másnap a plakkokat megszámoltuk.

#### **3.4.2.2. Fág könyvtár fenntartása**

1. A fenti titráláshoz hasonlóan előkészítettük az *E.coli* XL1-Blue MRF baktérium szuszpenziót (lásd fent 1.pont);
2. 600µl baktérium szuszpenzióhoz annyi bakteriofág szuszpenziót adtunk, amennyi 50000 fág részecskét tartalmaz (maximum 300µl);
3. jól összekevertük, majd 15 percen át 37°C-on tartottuk;

4. 6.5ml fedőagart adtunk hozzá, szétöntöttük Petri csészékbe és 6-8 órán át 37°C-on inkubáltuk;
5. 10ml SM oldatot tettünk minden egyes Petri csészére és 4°C-on tartottuk éjszakán át;
6. az SM oldatot leszívtuk, 15% végtérfogat mennyiségű kloroformot adtunk hozzá és 15 percig szobahőmérsékleten tartottuk;
7. a sejttörmelék 10 percig 2000 g-n ülepítettük;
8. a felülúszót óvatosan leszívtuk, 0.3% kloroformot adtunk hozzá; a fág szuszpenziót 4°C-on tároltuk.

### 3.4.2.3. Fág-könyvtár szűrése -immunoblot

1. Baktérium szuszpenziót készítettünk úgy, mint titráláskor, és 0.1ml  $3 \times 10^4$  PFU-jú (milliliterenkénti fág részecske szám) fág szuszpenziót adtunk hozzá, majd 20 percig 37°C-on inkubáltuk;
2. 2.5ml LB fedőagart adtunk hozzá, és 1-2 napos LB-re öntöttük;
2. 1-2 órán keresztül szárítottuk, majd 3-5 órára 42°C-ra helyeztük;
3. a nitrocellulóz (NC-45, SERVA) filtert megjelöltük, 5 percig desztillált vízben áztattuk, majd szűrőpapíron szárítottuk;
4. a filtert ráhelyeztük, 10-12 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd tető nélkül 20 percig szárítottuk;
5. tompa végű csipesszel a filtert óvatosan lehúztuk és rögtön TNT-be merítettük;
5. a szűrőt 30 percig mostuk 100ml PBSTM -ben keverés mellett;
6. 1 órát inkubáltuk először az antitesttel kb.0.1ml/cm<sup>2</sup> membrán, keverés mellett;
7. háromszor mostuk 3 percig 100ml PBSTM ben, keverés mellett;
8. 1 órát inkubáltuk a második antitesttel kb.0.1ml/cm<sup>2</sup> membrán, keverés mellett;
9. háromszor mostuk 3 percig 100ml PBSTM ben, keverés mellett;
10. NBT-BCIP szubsztrátban inkubáltuk sötétben amíg a foltok előjöttek (kb.20 perc) (ha tovább tartjuk erősödik a háttér);
11. a filtert stop oldatban mostuk, majd 5 percig 80°C-on szűrőpapíron szárítottuk.

TNT: 10mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20

5x PBSTM: PBST (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 4.5% NaCl, 0.5% Tween), 100ml 0.5M NaPO<sub>4</sub> pH 7.2, 45 g NaCl, 5ml Tween20, kiegészítve 1000ml-re, 25% zsírmentes tejpor



Antitest I                    1 rész 5x PSMTM, 4 rész H<sub>2</sub>O, 5 rész hibridoma kultúra, 0.1ml/cm<sup>2</sup>  
membrán

Antitest II                    10ml 1x PBSTM, 25µl enzim konjugált IgG

NBT-BCIP oldat: 33µl NBT-t 7.5ml szubsztrát oldathoz Petri csészében, + 25µl BCIP

NBT (nitroblue tetrazolium): 75 mg/ml 70% dimetilformamidban

BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate): 50 mg/ml 70%  
dimetilformamidban

szubsztrát oldat: 50ml 1M Tris, 10ml 5M NaCl, 2.38 g MgCl<sub>2</sub>, kiegészítve  
400ml-re Dv-vel, pH 9.5, kiegészítve 500ml-re

Stop oldat: 20 mM Tris, 0.5 mM EDTA, pH 7.5

### 3.5. Egyéb alkalmazott módszerek

#### 3.5.1. Klónozás

##### A PCR termék tisztítása

Ligálást megelőzően a PCR termékeket a minta térfogatával megegyező mennyiségű fenol/kloroform keverékével extraháltuk, majd a DNS-t izopropanollal kicsaptuk, és centrifugálással ülepítettük.

Abban az esetben, ha a PCR terméket restriktációs enzimmal is emészteni akartuk, a fent leírt eljárás után a dNTP-től, primerektől és a maradék enzimtől egy speciális szűrővel (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) mentesítettük.

##### A PCR termékek klónozása A-T klónozó plazmidba

A PCR reakció során olyan DNS szakaszok keletkeznek, amelyek 3' végén egy extra adenin van. Tehát a termék ligálásához speciális, 3' végén extra timinnel rendelkező (ún. A-T klónozó) plazmidot volt célszerű használni. Mi a pGEM plazmiddal (pGEM –T, Promega) dolgoztunk. A ligálást a gyártók útmutatása szerint végeztük, azzal a különbséggel, hogy 15°C-on éjszakán át inkubáltuk.

##### Szubklónozás expressziós plazmidba

Az A-T klónozó plazmidból speciális (restriktációs endonukleáz hasítási helyet tartalmazó) primerekkel felszaporított PCR terméket és az expressziós plazmidot (pQE40, The QIAexpressionist, QIAGEN) a fent leírt tisztítás után két restriktációs endonukleázzal emésztettük a gyártók útmutatása szerint 2-2 órán keresztül, majd a vágott fragmenteket a

vágtalantól 1% agaróz gélen elválasztottuk. A gélből a megfelelő szakaszokat tartalmazó részeket kivágtuk, és egy speciális gyantás módszerrel visszanyertük (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Promega). Az így kapott DNS darabokat a következő paraméterek mellett ligáltuk éjszakán át, 15°C-on: 20µl emésztett plazmid, 37µl emésztett PCR termék, 6µl 10x ligáz enzim puffer, 3U T4 ligáz enzim (Fermentas).

### 3.5.2. Transzformálás

A transzformáláshoz ultrakompetens *E.coli* DH5- $\alpha$  és M15 (Promega) baktériumsejteket használtunk.

#### Ultrakompetens baktériumsejt előállítása

(Tang *et al.*, 1994)

1. 2ml folyékony LB táptalajba beoltottuk a megfelelő baktérium törzset, 37°C-on éjszakán át szaporítottuk;
2. a baktérium szuszpenziót 250ml SOB táptalajba (összetétel az alábbiak szerint) öntöttük és 18°C-on szaporítottuk erős rázás mellett, amíg az OD<sub>600</sub> el nem érte a 0,6-os értéket;
3. 10 percre jégre tettük;
4. a sejteket 2500 g-n 10 percig 4°C-on ülepítettük;
5. az üledéket szuszpendáltuk 80ml jéghideg TB oldatban, 10 percig jégen tartottuk;
6. a sejteket 2500 g-n 10 percig 4°C-on ülepítettük;
7. az üledéket 20ml jéghideg TB oldatban szuszpendáltuk;
8. 7% végtérfogatnyi DMSO-t (metil szulfoxid) adtunk hozzá és 10 percig jégen tartottuk;
9. 80µl-enként szétosztottuk Eppendorf csövekbe és -70°C-on tároltuk.

Ligálást követően az egész ligációs keveréket, egyéb esetekben (plazmid átranszformálása más baktériumtörzsbe) az 50 pg plazmidot tartalmazó oldatot finoman összeráztuk 80µl - 80°C-on tárolt glicerines ultrakompetens baktérium szuszpenzióval. A transzformációs keveréket 30 percen át jégen tartottuk, 40 másodpercre 42°C-ra helyeztük, majd 400µl 37°C-os folyékony SOC táptalajt adtunk hozzá. Öt perc elteltével a szuszpenziót megfelelő antibiotikum (DH5- $\alpha$  esetében 100 mg/l ampicillin, M15 esetében 100 mg/l ampicillin és 25 mg/l kanamicin) tartalmú szilárd LB táptalaj felszínére szélesztettük (1-1 Petri csészére maximum 120µl-t) és a Petri csészéket fordított helyzetben 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül.

SOC táptalaj: SOB táptalaj 20mM glükózzal kiegészítve (1000ml-be 20ml steril 1M glükóz oldat)

SOB táptalaj: 960ml desztillált vízben 20 g bakto-tripton, 5 g élesztő kivonat, 0.5 g NaCl, 10ml 250mM KCl, pH 7.0 kiegészítve 1000ml-re, autoklávozva

TB oldat: 1000ml-ben: 10mM Pipes, 55mM MnCl<sub>2</sub>, 15mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM KCl, pH 6.7 (5N KOH-val)

### 3.5.3. Plazmid kivonás és plazmid méretének meghatározása

A ligálás sikerességének megállapítására plazmidot izoláltunk alkalikus preparálási módszerrel (Sambrook *et al*, 1989).

1. A plazmidot hordozó baktériumot a szükséges antibiotikumokkal kiegészített 2ml térfogatú folyékony LB táptalajban szaporítottuk éjszakán át 37°C-on.
  2. Az így nyert baktérium kultúrát egy perces centrifugálással ülepítettük 12000 rpm fordulaton, asztali centrifugával.
  3. Az üledéket 100µl I. oldatban [50 mM glükóz, 25 mM TrisHCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] szuszpendáltuk, majd 200µl II. oldat (0.2 N NaOH, 1% SDS) hozzáadásával jégen tartva lizáltuk 5 percen keresztül.
  4. A lizátum fehérje tartalmát 150µl III. oldat hozzáadásával (60ml 5 M kálium acetát, 11.5ml 96%-os ecetsav, 28.5ml H<sub>2</sub>O) kicsaptuk és asztali centrifugával ülepítettük.
  5. A felülúszót áttöltöttük Eppendorf csőbe, majd a plazmidot kétszeres térfogatú 96%-os etanollal kicsaptuk és asztali centrifugával ülepítettük.
  6. A plazmid üledéket beszárítottuk és 50µl steril desztillált vízben feloldottuk.
- Méretüket agarózgél-elektroforézissel ellenőriztük.

### 3.5.4. Fehérje termeltetés és tisztítás

#### Rekombináns fitoplazma fúziós fehérje termeltetés *E.coli* M15-ben

1. 10ml, 100 mg/l ampicillin és 25 mg/l kanamicin tartalmú LB táptalajt beoltottunk *E.coli* M15 baktériummal, 37°C-on éjszakán át szaporítottuk;
2. az így nyert baktérium szuszpenzióból 2.5ml-rel beoltottunk 50ml előmelegített LB táptalajt és erős rázás mellett OD<sub>600</sub> 0.5-0.7-ig szaporítottuk;
3. 1ml-t kivettünk, leülepítettük és a csapadékot 50µl SDS-PAGE minta-pufferben szuszpendálva -20°C-ra tettük az elektroforézisig;

4. a maradék baktérium szuszpenzióban 1mM IPTG ( $\beta$ -D-thiogalactopiranosid) hozzáadásával indukáltuk az expressziót minimum 4 órán keresztül;
5. óránként 1ml mintát vettünk és a 3. pontban leírtak alapján lefagyasztottuk;
6. végül az eltett mintákat felolvasztottuk és 4000 g-n 20 percig centrifugáltuk.

### **Fehérje kivonás**

1. Az üledéket 5ml lízis oldatban visszaoldottuk natív tisztításhoz;
2. 1 mg/ml lizozimot adtunk a mintákhoz és 30 percig jégen tartottuk;
3. 6-szor 10 percig 10 másodperces megszakításokkal 200-300 wattos teljesítményen ultrahangos kezelésnek vetettük alá;
4. a lizátumot 10000 g-n 4°C-on 20-30 percig centrifugáltuk és a felülúszót (durva kivonat, oldható fehérjék) átöntöttük tiszta csőbe és jégen tartottuk;
5. az üledéket (durva kivonat, oldhatatlan fehérjék) 5ml lízis oldatban felfuszpendáltuk és jégen tartottuk.

SDS-PAGE minta-puffer: 3%  $\beta$ -merkaptóetanol, 3% SDS, 0.3% brómfenol-kék, 10% glicerol

lízis oldat natív kivonáshoz: 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8.0; 300mM NaCl, 10mM imidazol

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### 4.1. Fitoplazma fertőzések okozta tünetek

A fitoplazmák általánosságban sárgulásos, törpülésszerű és boszorkányseprűs tüneteket okoznak a növényeken. A tünetek néhány növényfaj és fitoplazma csoport (japán szilva, kajszi - ESFY) esetében nem túlságosan jellegzetesek; időnként könnyen összetéveszthetők egyes vírus, baktérium, vagy növényvédőszer által okozott kór-, illetve kárképpel. Ezért a kizárólag tünet alapján történő besorolást körültekintően kell alkalmazni. Az almafa boszorkányseprűsödése; a sztolbur; a herevirág elleveledése és egyes növényekben az őszirózsa sárgulás (káposzta fajokon) által okozott tünetek azonban egyértelműen utalnak a fitoplazma jelenlétére.

A következőkben fitoplazma fertőzött növényeken látható tünetek szerepelnek, ahol a fertőzöttséget molekuláris módszerekkel igazoltuk.

#### Őszirózsa sárgulás (AAY-american aster yellows)

Az egészséges káposzta (*Brassica oleracea* convar. *capitata*) fejét a megrövidült hajtástengelyen (torzsa) szorosan egymásra boruló levelek alkotják (2. ábra). Ezzel szemben a beteg fejes és vörös káposzta kis mértékben megvastagodott, ugyanakkor erősen megnyúlt torzsán a levelek –az alsóktól eltekintve- torzák és nem fejlődnek ki rendesen (3. ábra). Az alsó levelek szétállnak, néha lefelé hajlanak, a torzsán pedig végig apró, húsos, kanalasodó levelek nőnek (4. ábra).

A káposzta nem képez fejet, étkezésre teljesen alkalmatlan. A fertőzött káposzta gyökerei megvastagodottak, kevésbé elágazóak és a hajszálgökereik hiányoznak. Amennyiben a fertőzés a fejképződés után következik be, korai virágzás figyelhető meg. Ugyanezek a tünetek figyelhetők meg a vörös káposzta (*B.oleracea* convar. *capitata* f. *rubra*) esetében is (5. ábra).

A karfiol (*B.oleracea* convar. *botrytis*) zöld levelekkel körülvett, fehér, elhúsosodott meddő virágát fogyasztjuk. Ha a növény még korai fejlődési stádiumban fertőződik, akkor virágkezdemény megjelenik ugyan, de kicsi marad, tehát alkalmatlan lesz a felhasználásra. Ha a fertőzés már kifejlett állapotban éri, akkor inkább a másodlagos fertőzések (baktériumok, gombák) okoznak nagy károkat. Ez nemcsak a karfiol esetében van így, hanem a többi káposztafajon is.



2. ábra. Egészséges fejes káposzta  
hosszanti metszete



3. ábra. AAY-val fertőzött fejes káposzta  
hosszanti metszete



4. ábra. AAY-val fertőzött fejes  
káposzta torzult, lefele kanalasodó  
levelei



5. ábra. AAY-val fertőzött vörös káposzta

A fertőzött kelkáposzta (*B.oleracea* convar. *bullata*) nagy bodros levelei nem alkotnak zárt fejet. A fitoplazmás növény levelei -hasonlóan a többi káposztafajokhoz- kissé lefelé állnak és kisebbek a normálisnál (6. ábra).

Az egészséges bimbóskel (*B.oleracea* convar. *gemmifera*) levélhóraljaiban levő megvastagodott rügyeit fogyasztjuk. A beteg növény megnyurgul, a rügyek aprók maradnak, sárgulnak és élvezhetetlenek (7. ábra).

A hazai irodalomban ezt megelőzően nem írtak le hasonló tüneteket és nem találtak AAY fitoplazmát a fent említett káposzta fajokon.

A pohánkán (*Fagopyrum dumetorum*) a tünetek nem specifikusak. Általános sárgulás, hajtásszáradás és a levelek méretének csökkenése figyelhető meg (8. ábra).

Eddig nem találtunk adatot a pohánkán előforduló fitoplazma fertőzésről a hazai, és a nemzetközi irodalomban sem. Elsőként írtuk le az őszirózsa sárgulás fitoplazmát pohánkán.

### **Sztoibur**

A sztoibur fertőzésről gazdag hazai irodalom áll rendelkezésünkre az 1960-as években tomboló járványoknak köszönhetően (Petróczy, 1962, 1965; Milinkó és munkatársai, 1960; Gáborjányi és Lönhárd, 1967). Az említett közlemények a burgonya, paradicsom, paprika és dohánytáblák nagymértékű fertőzöttségéről számolnak be. Az általunk megfigyelt tünetek egyeznek a szerzők által leírtakkal. A mai molekuláris biológiai módszerek segítségével alátámasztottuk az 1960-as évekbeli megfigyeléseket a paradicsom, paprika és dohány növények esetében.

A paprikán (*Capsicum annuum*) általános klorózis figyelhető meg. A sárgulás a fiatal hajtások felől indul, és végighalad az egész növényen. A levelek kanalasodnak, végül lehullanak. Az egész tő lombtalanná válik, a bogyók összeaszalódnak (9. ábra).

A paradicsomon (*Lycopersicon esculentum*) jellegzetes tünetek mutatkoznak. A hajtásvégek elseprősödnek. A levelek csökevényesek és sodrottak. A legjellegzetesebb tünetek a virágokon látszódnak. A virágok torzak, csészelevelük megnagyobbodik, a szíromlevelek hiányoznak. A bogyók, ha egyáltalán kifejlődnek aprók maradnak, és hamar elfásodnak (10. ábra).





6.ábra. AAY-val fertőzött  
kelkáposzta



7.ábra. AAY-val fertőzött bimbóskel



8.ábra. AAY-val fertőzött pohánka





9. ábra. Sztolburos paprikapalánta (balra), deformálódott, apró paprika (jobbra fent) és foltokban előforduló sztolbur fertőzés egy paprikatáblában (jobbra lent)



10. ábra. Sztolburos paradicsom hajtásvége (balra), tipikus sztolburos virág (jobbra)

Zeller (*Apium graveolens*) esetében a levéllemez elsárgul, az erek zöldek maradnak, majd az egész levél fokozatosan bíbor színt ölt. A levelek a normálishoz képest tömzsibbek. Végül a levelek elszáradnak, és a növény elpusztul (11. ábra).

A fertőzött sárgarépa (*Daucus carota*) és a petrezselyem (*Petroselinum crispum*) levelei a zellerhez hasonlóan sárgás és vöröses elszíneződést mutatnak, majd elszáradnak (12. ábra). Az el nem pusztult növények gyökeréből a következő tavasszal is ki tudtuk mutatni a fitoplazma jelenlétét. Mihelyt a rostacsövek kifejlődtek, a kórokozó az új hajtásokban is megjelent, tehát a gyökérből a növény újrafertőződött. Így nyilvánvalóvá vált, hogy a kórokozó át tud telelni a gyökerekben és a következő évben újra felszaporodva forrásként szolgálhat a vektor szervezeteknek.

A hazai irodalomban eddig nem találtunk adatot a zelleren, sárgarépan és petrezselymen előforduló sztolbur fertőzésről.

A sztolburos szőlőn (*Vitis vinifera*) nagyon szembeűnő a levelek sárgulása, illetve erős bíbor színű elszíneződése (13. ábra). Megfigyeltük a hajtások egyenlőtlen fásodását is, a vesszők ősszel nem értek be és puhák maradtak. A be nem ért hajtások csüngő habitust mutattak. Az általunk vizsgált szőlő mintákból, hasonlóan Szendrey és munkatársai (1996) megfigyeléseihez, sztolbur fitoplazmát mutattunk ki, holott a tünetek alapján, a környező országokban szőlőn jelentős károkat okozó szőlő sárgaság fitoplazma (*Flavescens dorée*, *Vergilbungskrankheit*) jelenlétére számíthattunk.

Repcén (*Brassica napus convar. napus*) elsősorban seprűsödés látható a növény felső részein (14. ábra). A virágok zöldek és terméketlenek. Horváth (1969) azonos tünetekről számolt be repcén. Kórokozóként a here törpülés fitoplazmát jelöli meg. Véleményünk szerint az akkor leírt betegséget a feltételezhetően inkább a sztolbur fitoplazma okozhatta, amit az akkori módszerekkel még nem lehetett elkülöníteni.

Dohányon (*Nicotiana tabacum*) a levelek kanalasak, a hónaljajtások sűrűn növekednek, és általánosan sárgulnak. A virágzat elzöldül, és nem képez magot (15. ábra).

A csattanó maszlag (*Datura stramonium*) felső harmada teljesen elbokrosodik, a levelek aprók, ráncosak, esetenként a levéllemez elsárgul. A virágok elzöldülnek és még a kinyílás előtt elszáradnak. A betegség tüneteiről és a kórokozóról pontos adatokat találhatunk Szirmai 1956-os közleményében.

A hólyagos habszegfű (*Silene otites*, 16. ábra) és a pitypang (*Taraxacum officinale*, 17. ábra) esetében a legfeltűnőbb tünetek a virágokon láthatók. A szíromlevelek csökevényesek és

szinte teljesen zöldek. Termés nem képződik. Eddig nem találtunk adatot a hólyagos habszegfű és a pitypang sztolburos betegségéről sem a hazai, sem a nemzetközi irodalomban

### **Csonthéjasok európai sárgulása (ESFY-european stone fruit yellows)**

Kajsi (*Prunus armeniaca*) esetében a betegség szimptómái attól függően változnak, hogy a kórokozó fiatal, vagy idős korban támadja-e meg a fát. A fiatalon megfertőződött fákban a kórokozó szisztemikusan terjed. A leveleken a tipikus szimptómák májusban jelennek meg; a fiatal levelek kúpszerűen kanalasodnak (18. ábra). Rendszerint a zöld főereket világoszöld zónák övezik, aminek következtében az egész fa, illetve a megtámadott ágak lombozata sárgászöld színű lesz (19. ábra). A kérget lehántva láthatóvá válik a hancs kezdetben narancssárga, később világosbarna színe. A hancs pusztulására jellemző, hogy eltérően a *Pseudomonas syringae* baktériumos, és különböző gombás fertőzésektől, sohasem kíséri mézgaképződés. A kemény téli fagyok különösen meggyorsítják a hancs károsodását. Ilyenkor a fertőzés mértékétől függően a fa a kihajtás után részben, vagy teljesen elpusztul. Enyhe teleken a beteg fák november végén, december elején kivirágozhatnak, majd a később bekövetkező fagyok hatására elpusztulnak. A betegségnek ez a tipikus szimptómája főleg a hazánktól délebbre található területeken fordul elő rendszeresen. Nálunk időről-időre látható, de nem általános. A fiatalon megfertőződött fák 6-8 év elteltével gutaütésre jellemző szimptómákkal hirtelen elpusztulnak. Ha idősebb (6-8 éves) korban következik be a fertőződés, akkor csak a fa egyes ágai fertőződnek és pusztulnak el (20. ábra). Számos esetben, amikor a fák erős növekedésűek, különösen a "Magyar legjobb" fajtán a betegség tipikus szimptómái nem látszanak. Csak a beteg fák világoszöld színéből és növekedési erélyének csökkenéséből következtethetünk arra, hogy a fa nem egészséges, és valószínűleg fitoplazmás fertőzéssel állunk szemben (21. ábra). A gyümölcsösben a betegség körkörösén terjed. Rendszerint a körben pusztuló fák közepén található egy kipusztult fa, amelyről a betegség szétterjedt.

A fertőzött japán szilva (*Prunus salicina*, 22. ábra.) a kajsiéhoz hasonló tüneteket mutat. A levelek sárgulnak, kanalasodnak, idővel az egész hajtás elszárad, végül az egész fa elpusztul. A fa elszáradt tövéből a fertőzött alany kihajt torz, törpe hajtásokkal és sárguló kanalas levelekkel (23. ábra).

Cseresznyén (*Prunus avium*) először a kisebb ágak, majd a vázágak is fokozatosan elszáradnak. Hasonlóan az ESFY fertőzött sajmeggyhez (Varga *et al.*, 2001), a levelek



11. ábra. A sztolbur fertőzés egyes szakaszai zelleren



12. ábra. Sztolburossárgarépa leveleinek elszíneződése a betegség előrehaladtával



13. ábra. Sztolburosszőlő elszíneződött levelei



14. ábra. Egészséges (jobbra) és sztolburossárgarépa (balra) repce virágzata





15. ábra. Sztolburos dohány virágzata



16. ábra. Sztolburos hólyagos habszegfű virága



17. ábra. Sztolburos pongyola pitypang virága



18. ábra. ESFY-vel fertőzött kajszi kanalasodó levelei



19. ábra. ESFY-vel fertőzött kajszin látható általános sárgulás



20. ábra. Tipikus kép egy idős ESFY-vel fertőzött kajsziról



21. ábra. Egész lombozatra kiterjedt sárgulás

kanalasodnak, kisebbek és torzak, csúcsuknál kiszélesednek (24. ábra). A legjellegzetesebb tünet cseresznyén (ami a sajmeggyen nem fordul elő) a leveleken figyelhető meg. A levéllemez sárgul, csak az erek maradnak zöldek. Messziről az egész fa gutaütésre emlékeztető tüneteket mutat (25. ábra).

A mandulafa (*Prunus amygdali*) levelei általánosan sárgulnak, kisebbek, keskenyebbek (méretük körülbelül fele az egészségesnek) és törékenyek, könnyen morzsolhatók. Egyes esetekben messziről a zöld lombzatban sárga, seprűs foltokat fedezhetünk fel (26. ábra). Ha a leveleket közelebbről megnézzük, és az előzőekben leírt tüneteket tapasztaljuk, érdemes a fát további vizsgálatnak alávetni.

A hazai irodalomban eddig nem közölték az ESFY fitoplazma előfordulását kajszin, japán szilván, mandulán és cseresznyén.

### **Almafa boszorkányseprűsödése (AP-apple proliferation)**

A fertőzött almafák (*Malus domestica*) súlyos tüneteket mutatnak. A hajtások és az ízkezők megrövidültek. A fiatal és idős hajtások elveszítik apikális dominanciájukat, így számos oldalhajtás fejlődik ugyanazon helyen, és már messziről kitűnnek a boszorkányseprűs fák. A levéllyél tövével több kis levélke is fejlődhet (27. ábra). A termések aprók, néha íztelenek.

### **Herevirág elleveledése (Clover Phyllody-CPh)**

A fehér herén (*Trifolium repens*) a fitoplazma fertőzés nagyon jellegzetes tüneteket okoz. A virágzat közepéből hosszú levéllyélen ülő, összetett levelek nőnek ki. A szirmok elszáradása után a hajtás tovább él (28. és 29. ábrák).

A hazai irodalomban már találkozhattunk a clover phyllody leírásával fehér herén (Rainiss, 1961), ám megfigyeléseink, és a modern eszközök segítségével alátámasztott eredményeink tükrében, az akkor leírt fitoplazma nagy valószínűséggel a sztolbur lehetett. Rainiss a Clover Phyllody-t *here virágzöldülésnek* fordította, ami a betegség tüneteit jellemzi is, de a kórokozó nem egyezik a CPh fitoplazmával.

A **százzorszép** (*Bellis perennis*) esetében eddig nem sikerült csoportszinten azonosítani a kórokozó fitoplazmát. A fertőzött növényeknek jelentősen (legalább háromszorosan) megnagyobbodott a virágfészke, a szirmlevelek zöldek. A levelek merevek, aprók és deformáltak (30. ábra).





22. ábra. ESFY-vel fertőzött japán szilva



23. ábra. Az elszáradt japán szilva kihajtott alanya



24. ábra. Egészséges és ESFY-vel fertőzött cseresznye levél



25. ábra. Pusztuló, ESFY-vel fertőzött cseresznyefaág



26. ábra. ESFY-vel fertőzött mandulafa





27. ábra. Egészséges (balra) és AP-val fertőzött (jobbra) almafa levelei



28. ábra. Egészséges (balra) és CPh-val fertőzött (jobbra) here virága



29. ábra. Ellevelesedett, CPh-val fertőzött herevirág



30. ábra. Fitoplazma fertőzött százszorszép deformálódott virága

## 4.2. Az egyes fitoplazma csoportok kimutatása és meghatározása

A fertőzött növényi mintákban három féle módon mutattuk ki a fitoplazmák jelenlétét. Az egyik egy közvetlen, DAPI festéses-epifluoreszcens mikroszkópos eljárás, a másik kettő pedig közvetett, molekuláris biológiai módszer; a DNS hibridizáció és a polimeráz láncreakció.

### 4.2.1. Epifluoreszcens kimutatási módszer (DAPI teszt)

A fertőzött növényeknek csak a floemében találtunk DAPI-val festődött, apró ragyogó pontokat (festődött fitoplazma DNS, 31. ábra). Az egészséges növényi mintákban hasonló foltokat nem észleltünk.



31. ábra. Festődött fitoplazma DNS

A kimutatás során az optimális vágási vastagság a 15µm-es volt, amelyet hűthető vágóélű mikrotommal sikerült elérni. Az ennél vékonyabb minták kezelhetetlenek voltak; roncsolódtak, gyűrődtek, az ennél vastagabbaknál pedig a túl sok sejtréteg miatt nem lehetett látni a fitoplazmákat. A legalkalmasabb nagyítás az 55-szörös volt.

A módszer hátrányaként meg kell említeni, hogy alacsony fitoplazma koncentrációnál (például tavasszal, vagy friss fertőzés esetén) könnyen előfordulhat, hogy nem találunk fitoplazmát a mintában. Tehát ez az eljárás egyáltalán nem tekinthető kielégítően érzékeny módszernek. Ezért használjuk rutinszerű kimutatásra a polimeráz láncreakciót, melynek során az esetlegesen alacsony számban jelenlevő fitoplazma DNS-ét felszaporítjuk. Jelenleg ez a legérzékenyebb kimutatási módszer.

### 4.2.2. A fitoplazmák kimutatása és meghatározása molekuláris biológiai módszerekkel

#### 4.2.2.1. Mintavétel

A mintavételre a legideálisabb időszak a késő nyár, vagy kora ősz, ugyanis ekkorra szisztemizálódik a fitoplazma fertőzés, valamint a fitoplazma koncentráció is megfelelő a kimutathatósághoz. A pusztuló, vagy már elpusztult részekből nem lehet a kórokozót kimutatni. Télen a fitoplazmák visszahúzódnak a föld alatti részekbe, és ott telelnek át. Így télen a gyökerekből izolálhatunk fitoplazma DNS-t, bár ez fás növények esetében elég nehézkes.

A fitoplazma DNS legnagyobb mennyiségben az erekből, illetve levélgyeletekből; a fás részekben belül pedig közvetlenül a floemből vonható ki.

Kis levelű, lágyszárú növények esetében felhasználhatjuk az egész levelet is a levélgyelettel együtt.

#### 4.2.2.2. DNS kivonás

Az összegyűjtött mintákból az anyag és módszer részben leírtak alapján vontuk ki a fitoplazmában gazdag DNS-t. Az így nyert DNS oldat az esetek nagy részében megfelelő tisztaságú volt a további vizsgálatokhoz.

Két növényfaj (paradicsom, cseresznye) DNS kivonata olyan sok gátló anyagot tartalmazott, amely már megakadályozta a polimeráz láncreakcióban az enzim működését. Az inhibitor jelenlétét úgy mutattuk ki, hogy fitoplazma fertőzött rózsameténg DNS-hez paradicsomból és cseresznyéből származó DNS oldatot adtunk és ezt a keveréket vetettük alá PCR-nek. Pozitív kontrollként a fertőzött rózsameténg DNS-t használtuk. Azokban az esetekben, amikor hozzáadtuk a paradicsom, vagy cseresznye DNS oldatot, mindig negatív eredményt kaptunk. Tehát ezek a minták olyan inhibitort tartalmaztak, amelyek megakadályozták a reakció működését.

A paradicsom esetében az immunoblot módszerben használt mosó oldat mintájára, amely tejport tartalmaz (vagy BSA-t), különböző mennyiségű (0,5-3 v/v) steril, zsírmentesített tejet adtunk a PCR elegyhez. A reakció az 1 v % mennyiségű tejet tartalmazó elegyben működött a legjobban. Tej hozzáadása nélkül egyáltalán nem kaptunk PCR terméket.

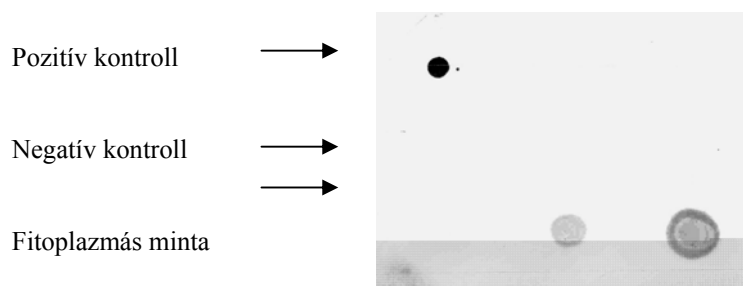
A cseresznye kivonatok feltételezhetően túl sok polifenolt tartalmaztak, amelyek szintén akadályozták a reakciót. Ebben az esetben a tej hozzáadása hatástalannak bizonyult, valamint a minták nagyfokú (tízszeres) hígítása is. Ezért egy kifejezetten fás növényekre kikísérletezett kivonási módszert próbáltunk meg alkalmazni. (Mergenthaler Emese, MTA NKI, szóbeli közlés). Az így kivont minták polimeráz láncreakciója során már kaptunk pozitív eredményt (ugyanazek a minták a Delladoyle kivonási módszerrel negatívak voltak). Nested PCR alkalmazásával több esetben is pozitív eredményt kaptunk, viszont ennél a módszernél fennállt az a veszély, hogy a reakció túlzott érzékenysége miatt sok esetben valamilyen szennyeződésnek (fitoplazma szennyezés) köszönhetjük a pozitív eredményt. Ezek a szennyeződések az eszközökről, de még a levegőből is eredhetnek. Néhány esetben a negatív kontrollok is pozitívak voltak, ami valóban biztos jele a szennyeződésnek. Ezért a nested PCR-rel fitoplazma fertőzöttnek mutató mintákra nem mondhatjuk egyértelműen, hogy valóban azok. A későbbiek során nem alkalmaztuk kimutatásra a nested PCR módszert.

#### 4.2.2.3. Dot blot - DNS hibridizáció

A hibridizációhoz ‘Delladoyle’ módszerrel vontunk ki DNS-t egészséges, fertőzöttségre gyanús, illetve ismert kontroll fitoplazmás növényekből.

Az anyag és módszer 3.3.2.2. részében leírtak szerint a jelölést és a hibridizációt elvégeztük.

Először csak az egészséges és a fertőzött kontroll növényi mintákat hibridizáltattuk, hogy megvizsgáljuk van-e valamilyen gyenge reakció az egészséges növények esetében is. A festést követően láthattuk, hogy csak a fitoplazma fertőzött növények DNS mintái festődtek. Egészséges növények esetében egyszer sem kaptunk pozitív választ (32. ábra). Ezen eredmények alapján már a fertőzöttségre gyanús növényeknél is alkalmazhattuk a módszert.



32. ábra. Fitoplazma fertőzés megállapítása dot blot módszerrel

A hibridizációval párhuzamosan elkezdtük a PCR-rel való kimutatást is, és nyilvánvalóvá vált, hogy a dot blottal történő kimutatás sokkal időigényesebb, valamint sokkal kevésbé érzékeny, és nem alkalmas az egyes fitoplazmák azonosítására sem. A felsorolt okokat figyelembe véve áttértünk a gyorsabb és érzékenyebb PCR technikára, amellyel az azonosítást is el tudtuk végezni.

#### 4.2.2.4. Polimeráz láncreakció (PCR, polymerase chain reaction)

##### A DNS mennyiség optimalizálása

Az egyszerű PCR alkalmazásánál eleinte problémáink adódtak, a reakcióhoz adott templát DNS mennyiségével. Az összehasonlító teszt DNS-sel (standardként használt pozitív DNS minta) a reakció működött, ellenben az általunk gyűjtött biztosan fitoplazma fertőzött mintákkal nem. Nem tudhattuk, hogy túl kevés, vagy túl sok DNS-t adtunk-e a reakcióelegyhez, hiszen a kivonások során ugyan egy fitoplazma gazdagító módszert alkalmaztunk, de végeredményben össz-DNS-t kaptunk, amiben nem ismerhettük a fitoplazma; azaz a templát DNS mennyiségét. Kísérleteinkben először azt vizsgáltuk, hogy ebből az össz-DNS-ből mennyi szükséges a reakció működéséhez. Az anyag és módszer

részben leírt kivonási módszert követve, az 1g növényi mintából kivont DNS-t 100 $\mu$ l-ben oldottuk fel és ebből 1-15 $\mu$ l-t adtunk a polimeráz láncreakció elegyéhez. Fitoplazma csoporttól és gazdanövénytől függően 2-10 $\mu$ l volt elegendő. A sztolbur fitoplazma esetében a reakció 2-3 $\mu$ l DNS-sel is jól működött, viszont 5 $\mu$ l-nél többel egyáltalán nem. A többi fitoplazma csoport (AAY, ESFY, AP, CPh) esetében ez pont fordítva volt. Ez abból következik, hogy a sztolbur fitoplazma nagy koncentrációban van jelen a növényekben.

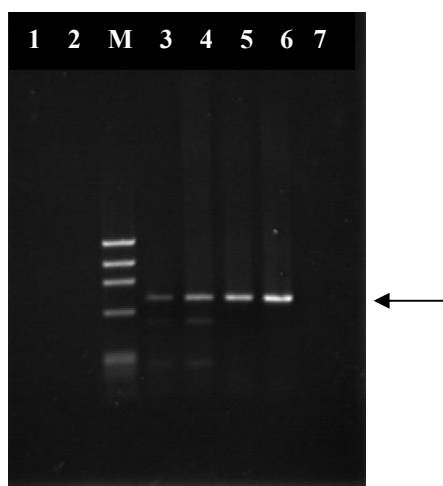
Megvizsgáltuk, hogy a túl sok (10 $\mu$ l-nél több) össz-DNS hozzáadásával miért nem működik a PCR. Vajon mi akadályozza a reakciót, a nagy mennyiségű növényi, vagy templát DNS? Szükséges-e a növényi DNS mennyiségének tovább csökkentése a kivonás során? Egészséges növényből egy, az inhibitorok hatását kizáró, nagy tisztaságú DNS-t eredményező módszerrel (CsCl-EtBr) DNS-t tisztítottunk, majd ebből különböző mennyiségeket (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400ng) adtunk egy jól beállított, optimálisan működő PCR elegyhez. A reakció minden esetben ugyanolyan hatékonysággal működött. Ebből arra következtettünk, hogy a nem-templát DNS mennyisége egyáltalán nem befolyásolja a PCR működését. Így nem volt szükség további növényi-fitoplazma DNS elkülönítő lépésekre. A túl sok templát DNS viszont képes megakadályozni a reakció működését.

### **PCR univerzális és specifikus primerekkel**

A mintákat először univerzális (fU3/rU5, fP1/rP7) primerekkel vizsgáltuk. Ezekkel a primerekkel minden eddig ismert fitoplazmát ki lehet mutatni, ezért a fertőzöttség megállapítására megfelelnek. Az fU3/rU5 primerekkel 880bp, az fP1/rP7 primerekkel pedig 1830bp nagyságú fitoplazma DNS-t kaptunk (33. ábra). Méretük alapján az fP1/rP7 primerekkel felszaporított termékek felhasználhatók az egyes fitoplazma csoportok meghatározására is RFLP módszer segítségével.

A jellegzetes sztolbur, AP és ESFY tüneteket mutató növények esetében csoport specifikus primereket is használtunk (sztolburra: fSTO/rSTOLS-621bp, ESFY-re: fO1/rO1-1074bp és AP-re: fAT/rAS-528bp), amelyekkel már nem csak a fertőzöttség tényét tudtuk megállapítani, hanem egyben a fitoplazma csoportot is azonosítottuk. Mivel kis méretű termékekről van szó, sokkal rövidebb PCR programot használhattunk.

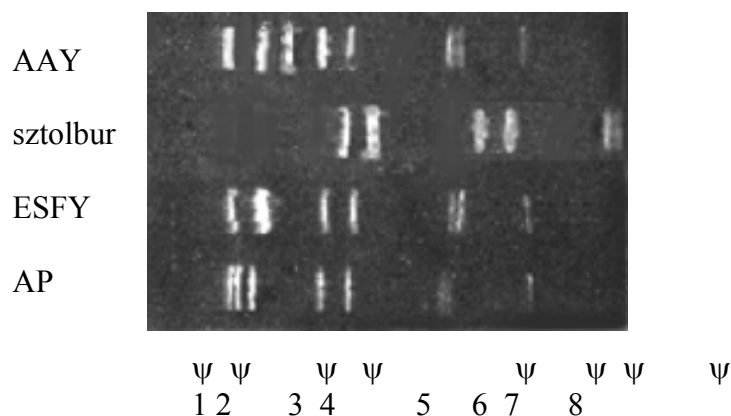
A PCR az irodalomban közölt hőmérsékleti értékeken jól működött.



33. ábra. fP1/rP7 primerekkel felszaporított ESFY (3), AP (4), AAY (5) és sztolbur (6) fitoplazma DNS. Az 1., 2. és 7. minták egészséges kontrollok, M=marker

#### 4.2.2.5. Restrikciós fragment analízis (RFLP, restriction fragment length polymorphism)

Az fU3/rU5 és az fP1/rP7 primerekkel felszaporított fitoplazma DNS fragmenteket kétféle restrikciós enzimmal (Alu1 és Rsa1) hasítottuk, majd 12.5 %-os poliakrilamid gélen a hasítási termékeket méret marker mellett elválasztottuk. A kapott kép <sup>1800bp</sup> lalmi adatokkal összevetve az egyes fitoplazma csoportokat azonosítottuk (34. ábra).



34. ábra. fP1/rP7 primerekkel felszaporított fitoplazma DNS hasítási képe. Az emésztés Alu1 restrikciós endonukleázzal történt. Marker méretek 1-8-ig: 621, 521, 257, 215, 159, 100, 66 és 42bp

Egy esetben; a százszorszépből fP1/rP7 primerekkel felszaporított DNS szakasz nem felelt meg az elvárt méretnek, és a fent említett két enzim egyike sem hasította. Eddig nem sikerült a növényben levő kórokozót azonosítani. Feltételezhetjük azt is, hogy valamilyen egyéb, a *Mollicutes* osztályba tartozó kórokozót találtunk. A minták pozitív eredményt adhattak a

polimeráz láncreakció során valamilyen más közeli rokonságban levő kórokozóval való fertőzöttség esetén is, mert az indítószekvenciákat konzervatív 16S rDNS szakaszra tervezték.

#### **4.3. A Magyarországon előforduló fitoplazmák és gazdanövénykörük**

1995 nyarától 2000 őszéig 45 növényfajon kerestünk fitoplazma fertőzést az ország több pontján. Összesen 24 növényfajon 5 fitoplazma csoportot azonosítottunk (AAY, sztolbur, ESFY, AP és CPh). 275 mintát vizsgáltunk meg, ebből 108 esetben tudtuk kimutatni a fitoplazma jelenlétét. Magyarországon elsőként írtuk le az ESFY fitoplazmát: kajszin, mandulán, japán szilván, és cseresznyén, az AP-t: almafán, az AAY-t: pohánkán és 5 káposztafajtán, valamint a sztolburt: zelleren, petrezselymen, sárgarépán, pongyola pitypangon és hólyagos habszegfűn. A sztolbur előfordulását pongyola pitypangon, hólyagos habszegfűn és pohánkán pedig nemzetközi irodalomban sem közölték előttünk.

A százszorszépen előforduló kórokozó fitoplazma csoportját eddig nem sikerült azonosítanunk, és az irodalomban sem találtunk erről semmilyen adatot.

2. táblázat. Az 1995-2000-ig vizsgált növényfajok és az azokban meghatározott fitoplazma csoportok

Gazdanövény		Vizsgált minták száma	Pozitív minták száma	Fitoplazma csoport
1	aggófű ( <i>Senecio vulgaris</i> )	2	0	
2	akác ( <i>Robinia pseudo-acacia</i> )	4	0	
3	alma ( <i>Malus domestica</i> )	7	1	AP
4	bab ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	1	0	
5	bimbóskelel ( <i>B.oleracea</i> convar.gemmifera)	2	1	AAV
6	bodza ( <i>Sambucus nigra</i> )	3	0	
7	burgonya ( <i>Solanum tuberosum</i> )	2	0	
8	büdöske ( <i>Tagetes erecta</i> )	3	0	
9	cukkíni ( <i>Cucurbita pepo</i> convar. giromontia)	1	0	
10	csattanó maszlag ( <i>Datura stramonium</i> )	2	2	sztolbur
11	cseresznye ( <i>Prunus cerasus</i> )	10	1	ESFY
12	csipkebogyó ( <i>Rosa canina</i> )	2	0	
13	dohány ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	1	1	sztolbur
14	fehér here ( <i>Trifolium repens</i> )	4	4	CPh
15	fejes káposzta ( <i>Brassica oleracea</i> convar. capitata)	6	4	AAV
16	hólyagos habszegfű ( <i>Silene vulgaris</i> )	3	3	sztolbur
17	japán szilva ( <i>Prunus salicina</i> )	30	19	ESFY
18	kajszi ( <i>Prunus armeniaca</i> )	43	29	ESFY
19	karfiol ( <i>B.oleracea</i> convar. botrytis)	4	1	AAV
20	katángkóró ( <i>Cichorium intybus</i> )	1	0	
21	kelkáposzta ( <i>B.oleracea</i> convar. sabauda)	2	2	AAV
22	körte ( <i>Pyrus communis</i> )	4	0	
23	mandula ( <i>Prunus amygdali</i> )	11	1	ESFY
24	meggy ( <i>Cerasus vulgaris</i> )	4	0	
25	mogyoró ( <i>Corylus avellana</i> )	31	0	
26	nyár ( <i>Populus nigra</i> )	4	0	
27	őszibarack ( <i>Persica vulgaris</i> )	7	0	
28	paprika ( <i>Capsicum annuum</i> )	12	6	sztolbur
29	paradicsom ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	8	6	sztolbur
30	parlagfű ( <i>Ambrosia elatior</i> )	2	0	
31	petrezselyem ( <i>Petroselinum crispum</i> )	5	5	sztolbur
32	pohánka ( <i>Fagopyrum dumetorum</i> )	4	3	AAV
33	pongyola pitypang ( <i>Taraxacum officinale</i> )	3	1	sztolbur
34	repce ( <i>B.napus</i> convar.napus)	7	7	sztolbur
35	sárgarépa ( <i>Daucus carota</i> convar. sativus)	2	1	sztolbur
36	somkóró ( <i>Melilotus officinalis</i> )	2	0	
37	százszorszép ( <i>Bellis perennis</i> )	3	2	?
38	szilva ( <i>Prunus domestica</i> )	5	0	
39	szőlő ( <i>Vitis vinifera</i> )	16	1	sztolbur
40	szulák ( <i>Convolvulus arvensis</i> )	2	0	
41	tatárlaboda ( <i>Atriplex tatarica</i> )	1	0	
42	mezei geránium ( <i>Geranium pratense</i> )	1	0	
43	rózsameténg ( <i>Catharanthus roseus</i> )	1	0	
44	vörös káposzta ( <i>B.oleracea</i> convar. capitata f. rubra)	1	1	AAV



45	zeller ( <i>Apium graveolens</i> )	6	6	sztolbur
----	------------------------------------	---	---	----------

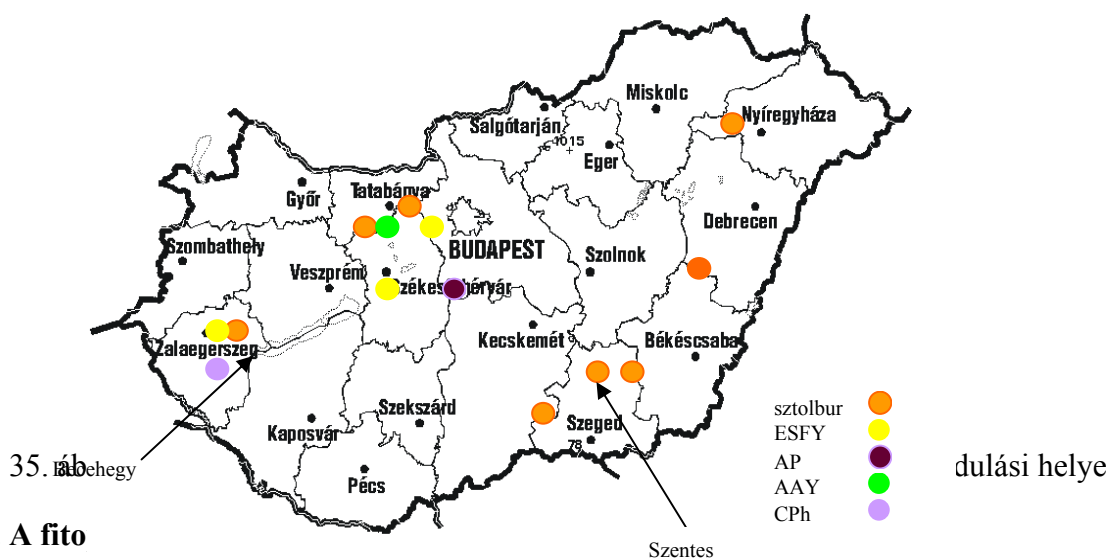
#### A Magyarországon előforduló fitoplazmák jelenleg ismert előfordulási helyei

1999 őszéig még csak részben sikerült feltérképezni a Magyarországon előforduló fitoplazmák és gazdanövénykörüket. A legtöbb minta Észak-Magyarországról, Budapest környékéről és a Balaton medence nyugati részéről származik (35. ábra). Az adatgyűjtés továbbra is folyamatban van.

Az irodalmi adatok Szabolcs-Szatmár; Hajdú-Bihar; Zala megye és a Duna-Tisza közti területek korábbi években megfigyelt nagymértékű sztolbur fertőzöttségéről számolnak be (Petróczy, 1965; Gáborjányi, 1967; Szendrey, 1996). Mi eddig jelentős sztolbur fertőzöttséget Zala, Heves, Pest, Békés és Csongrád megyében írtunk le, paradicsomon, paprikán, valamint egyes gyomokon és szőlőn. ESFY, AP és AAY fertőzött növényeket Pest és Zala megyében találtunk.

Egyes gyümölcsösökben (pl. Pomázon kajszi, Szigetcsépen japán szilva) egész sorok voltak fertőzöttek. Ez feltételezhetően a gyomirtás hiányosságának és az átvivő rovarok felszaporodásának köszönhető, hiszen az élőlő gyomokban a fitoplazmák áttelelnek, és következő évben forrásul szolgálnak a vektoroknak. A másik ok az oltóanyag fertőzöttsége lehet. (Japán szilva esetében nagy valószínűséggel ez történt). Ezért lenne nagyon fontos, hogy már az országba való bekerülés előtt kiszűrjük a fitoplazmás növényeket

A nem megfelelő rovarirtásnak a fitoplazma terjedésére gyakorolt hatását nem csak gyümölcsösökben figyeltük meg. A Boldog környéki paprika táblák némelyikében (egy-egy főlísiátrakban is) 95%-os sztolbur fertőzöttséget tapasztaltunk. Itt a táblák ugyan megfelelő rovar-, illetve gyomirtásban részesültek, ellenben a környező területek nem. A fertőzés valószínűleg onnan eredhetett.



#### 4.4. A fito

A standard fitoplazma csoportokat üvegházi körülmények között rózsameténg és dohány növényekben tartottuk, és tartjuk fenn. Saját gyűjtésű sztolburt paradicsomon tartunk fenn oltással, üvegházban. A PCR technikával ellenőrzött, fertőzött növények hajtásvégeit körülbelül félévente egészséges növényekre átoltottuk, így biztosítva a fitoplazmák fennmaradását (Anyag és módszer 3.2. fejezet). Egyedül a sztolbur esetében volt szükség 2-3 havonkénti átoltásra, mivel a kórokozó rendkívül agresszívnek bizonyult (szántóföldi körülmények között is), és igen gyorsan elpusztította a növényeket. A fitoplazmák rózsameténgen is súlyos tüneteket okoznak (36. ábra). Néhány irodalmi adat alapján megpróbálkoztunk az *in vitro* fenntartással is. Rózsameténg és kajszi növények hajtásvégeit fertőtlenítettük és táptalajra helyeztük. A beteg növények rosszul tűrték a táptalajon való tartást, sárgultak és leveleiket hamar eldobták. Ugyan három hónapon át életben maradtak, ám növekedésük nagyon elenyésző volt. A fitoplazmát ki lehetett mutatni belőlük, és az irodalomban közöltekkel megegyezően valóban könnyebb volt a növények feldolgozása (a szövetek lágyabbak), azonban a növényanyag kis mennyisége miatt nem láttuk értelmét a további kísérletezésnek.



36. ábra. Egészséges (bal felső), AP (jobb) és AAY (bal alsó) fertőzött rózsameténg virága

## 4.5. Fitoplazma gének keresése és vizsgálata

### 4.5.1. Fitoplazma gének keresése

A fertőzöttség kimutatása, és a kórokozó fitoplazma csoport azonosítása jelenleg még hosszadalmas és költséges eljárás. Ezért egy gyorsabb és költségkímélőbb módszer bevezetése (ELISA), valamint a fitoplazmák patogenitásának jobb megismerése (gének keresése) céljából kezdtünk el antiszérum előállítással foglalkozni.

Ennek során egy dossenheimi fitoplazmával foglalkozó csoport (Dr.Seemüller, BBA Dossenheim, Németország) által készített AP-expressziós lambda fág (Lambda ZAP II, Stratagene) könyvtárát vizsgáltuk a Diagnosticum KFT-vel együttműködésben előállított poliklonális antitesttel.

#### Fehérje tisztítás

A kísérleteket AP fitoplazma fertőzött rózsameténg (*Catharanthus roseus*) növényekkel kezdtük, egy egyszerű fehérje kivonási módszerrel. A rózsameténg növények szárát és leveleinek fő- illetve mellékereit dolgoztuk fel, azonban az ezzel a módszerrel előállított antiszérum nagyon erős háttérrel adott az egészséges növényekkel. Ezért a későbbiekben dohányból (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*) vontunk ki fehérjét egy fitoplazma gazdagító eljárással. (E.Seemüller, BBA, Dossenheim, Németország). Ennek során a dohány floemét elválasztottuk, és csak ezt használtuk fel a fehérje kivonáshoz. Így kiküszöbölhettük a fent említett problémát. Rózsameténg esetében ezt a módszert azért nem lehet alkalmazni, a floem többi növényi résztől való szétválasztása a gyakorlatban igen nehezen kivitelezhető művelet.

A fehérje kivonásához két módszert ötvöztünk. Az anyag szétdörzsölését egy, az ELISA módszerhez is használatos pufferben végeztük el. A puffer aszkorbinsav tartalma gátolta az oxidációt, a TRIS hatására pedig nagyobb mennyiségű fehérjét kaptunk. Ellenben a differenciált centrifugálás után az üledéket nem oldhattuk vissza ugyanebben az oldatban a TRIS tartalom miatt; az immunizáláshoz így nem lett volna felhasználható. Ezért a visszaoldáshoz GM puffert használtunk, amely az egerekre nézve nem tartalmaz mérgező anyagot.

A kapott fehérjeoldat optikai denzitását 595nm hullámhosszon megmértük, és a már előzőleg felállított standard görbe alapján a fehérje mennyiségét meghatároztuk. 25-30 g növényi anyagból kiindulva összesen 140-300µg fehérjét kaptunk. Az egerek immunizálásához minimum 100µg fehérje szükséges, úgyhogy a fent említett mennyiség elégségesnek bizonyult.

### Immunizálás

Az immunizálást a Diagnosticum KFT végezte. Ehhez minden esetben frissen készített antigént használtak. Ennek során monoklonális antitestet állítottak elő. Az immunizálás a kivonás végétől számított 1-2 órán belül megtörtént.

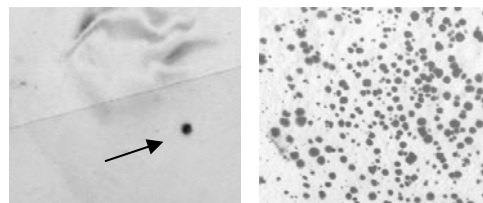
### Az antiszérumok ellenőrzése

Az előállított antiszérumok (monoklonális antitestek) mindegyikét ellenőriztük, hogy reagálnak-e az egészséges növényből kivont fehérjékkel. A vizsgálatot dot blot módszerrel végeztük. A rózsameténg esetében 17 szérumból 13 erős festődést mutatott az egészséges minták esetében is. A dohánynál már jobb eredményt kaptunk 5 szérumból 4 csak az AP fitoplazma fertőzött mintákkal adott pozitív választ. Ez a fitoplazma koncentráló fehérje kivonási módszernek volt köszönhető. A fitoplazma-fágkönyvtár vizsgálatát az egészséges növényi fehérjével nem reagáló szérumokkal végeztük.

### Immunoblot

Első lépésként a fágkönyvtárat titráltuk. Az immunoblothoz  $3 \times 10^4$  PFU koncentrációjú fáguszuszpenziót használtunk. Összesen két szérummal végeztünk immunoblot-ot (egy rózsameténgre és egy dohányra előállítottal). A rózsameténg fehérjére előállított antiszérummal nem kaptunk egyetlen pozitív fágplakkot sem, A dohány esetében két plakk festődött,

amelyet sikerült háromlépéses eljárással izolálni, majd felszaporítani (37. ábra).



37. ábra. Pozitív plakk (balra) felszaporítva (jobbra)

A pozitív fágokból az EsAssist helper fág (Stratagene) az inszertet tartalmazó fagemidot kivágta, majd cirkularizálta és becsomagolta. Ebből a fagemidből úgy kaptunk plazmidot, hogy egy speciális *E.coli* törzset; a SOLR-t fertőztük vele, amelyben a segítő fág nem tud szaporodni, valamint a lambda fág sem képes fertőzni. Így csak a plazmid marad fenn benne, és tökéletesen kiküszöbölhető a fág fertőzés. Ebben a baktérium törzsben a fagemid plazmidként működik.

### **A talált fitoplazma DNS szakaszok vizsgálata**

A plazmidokban levő inszerteket restriktációs endonukleázok segítségével kivágtuk, és a méretüket gél-elektroforézissel meghatároztuk. Sajnálatos módon az egyik szakasz mindössze 50bp, a másik pedig 100bp nagyságú volt. A kis méret alapján egyértelmű volt, hogy ezek az inszertek nem tartalmazhatnak egy teljes nyílt olvasási keretet. Tehát töredék fehérjét kódoló DNS szakaszokat találtunk, amelyek nem voltak alkalmasak antiszérum előállításra, rutinszerű kimutatáshoz.

A továbbiakban a véletlenszerű keresés helyett egy mások által már szekvenált AP fitoplazma génnel folytattuk a kísérleteket.

### **4.5.2. Az AP fitoplazma *tuf* génjének klónozása expressziós plazmidba antiszérum előállítás céljából**

A *tuf* gén által kódolt TU elongációs faktornak alapvető szerepe van a transzláció folyamatában, minden élő szervezetben. Ezért ezt a fehérjét nem csak antiszérum előállításra, hanem a különböző fitoplazmák antigénjeinek összehasonlítására is használni lehet (rokonsági fokok meghatározására).

A klónozást két lépésben kívántuk elvégezni, mert a PCR során közvetlenül növényből csak kis mennyiségű terméket kaptunk, aminek nagy része mindig elveszett a tisztítási eljárások során. Így először egy kis méretű, jól szaporodó A-T klónozó plazmidba tettük, majd a későbbiekben ebből szaporítottuk fel a gént, és használtuk fel szubklónozáshoz. Így sokkal több és tisztább terméket kaptunk, amivel könnyebben lehetett dolgozni.

A kísérlet menete:

1. primerek tervezése a már ismert fitoplazma AP gén szekvencia alapján, és az AP *tuf* gén felszaporítása a tervezett primerekkel AP fertőzött rózsameténg növényből
2. a termék klónozása A-T klónozó plazmidba
3. restriktációs endonukleáz hasítási helyet tartalmazó primerek tervezése
4. szubklónozás expressziós plazmidba
5. szekvenálás, szekvencia elemzése
6. rekombináns fitoplazma fúziós fehérje termeltetés *E.coli*-ban
7. a géntermék tisztítása nagy mennyiségben
8. egerek immunizálása
9. monoklonális antiszérum előállítása, tesztelése

1. Primerek tervezése a már ismert fitoplazma AP gén szekvencia alapján, és az AP *tuf* gén felszaporítása a tervezett primerekkel, AP fertőzött rózsameténg növényből

A *tuf* gén szekvenciáját Dr. Michael Berg határozta meg (Berg and Seemüller, 1999). A kapott szekvencia alapján a primereket a szabályok figyelembevételével (körülbelül 50% A-T/G-C arány, 15-20bp hosszúság, a 3' végen lehetőleg G-C bázisok legyenek a biztos kapcsolódás érdekében, és biztosan megegyezzenek az eredeti szekvenciával, a tervezett szekvencia ne kapcsolódjon önmagához, illetve a másik primerhez stb.) megterveztük. A szekvenciák egymással és önmagukkal való összetapadásának lehetőségét, valamint az annealing hőmérsékletét egy internetes program segítségével vizsgáltuk ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)). Ha a kapott hőmérsékleti értékek között nagy (4-5°C) eltérés volt, vagy 6-7 bázisnál több helyen tapadtak össze akár önmagukkal akár a másikkal, újabb szekvenciákat kerestünk, amíg a megfelelő értékeket nem kaptuk.

A primer pár (fTUB/rTUB, Fodor Márk MTA NKI) szekvenciája egy bázistól eltekintve teljesen megegyezik az AP szekvenciával. Az eltérés oka az, hogy a forward primerben egy stop kód lett volna, ezért egy bázist meg kellett változtatni. Ezekkel a primerekkel AP fertőzött rózsameténgből ugyan kis mennyiségben, de sikeresen felszaporítottuk a kívánt szekvenciát (38. ábra).

```
GGAGATTTAAATAAAG/ATGTCTAGTAAAGTATTTTAAAGAGATAAAGTGCATGTTAATGTAGGAACATTGG
GGAGATTCAAATAAAG/ATGTCTAGTAAAGTATTTTAAAGAGATAAAGTGCATGTTAATGTAGGAACATTGG
fTUB
TCATGTTGATCATGGAAAACTACTTTGACTGCTGCTATTACTAAAATTTTATCAACAAAAGGCTTAGCAGAA
TCATGTTGATCATGGAAAACTACTTTGACTGCTGCTATTACTAAAATTTTATCAACAAAAGGCTTAGCAGAA

AATAAATCATATGATCAAATTGATAAACTAAAGAAGAAAAAGAACGTGGTATAACTATTAACACTACCCATG
AATAAATCATATGATCAAATTGATAAACTAAAGAAGAAAAAGAACGTGGTATAACTATTAACACTACCCATG

TTTCTTATGAAACTGTAAAAAGGCATTATGCTCATGTTGATTGTCTGACACGCTGATTATGTTAAAAATAT
TTTCTTATGAAACTGTAAAAAGGCATTATGCTCATGTTGATTGTCTGACACGCTGATTATGTTAAAAATAT

GATTACCGGTGCTGCGCAAATGGACGCTGGTATTTTAGTTGTTTCAGCTTATCATGGAGTAATGCCTCAAAC
GATTACCGGTGCTGCGCAAATGGACGCTGGTATTTTAGTTGTTTCAGCTTATCATGGAGTAATGCCTCAAAC

CGTGAACATGTTTTGTTAGCTGGACAAGTTGGTATCTCTAAATTGATAGTATTTTTAAATAAATGTGATTAG
CGTGAACATGTTTTGTTAGCTGGACAAGTTGGTATCTCTAAATTGATAGTATTTTTAAATAAATGTGATTAG

TTAAAGAAGAAGAATGGATTTCATTTAGTAGAAATGGAAGTTCGTGAATTATTAACGAATATAAATTTGATGG
TTAAAGAAGAAGAATGGATTTCATTTAGTAGAAATGGAAGTTCGTGAATTATTAACGAATATAAATTTGATGG

TGATAAACTCCTTTTGTAGAGGTTTCAGCTTTAAAAGCTTTAGAAGGCACAGATGTTGAAGGTATCAATAAA
TGATAAACTCCTTTTGTAGAGGTTTCAGCTTTAAAAGCTTTAGAAGGCACAGATGTTGAAGGTATCAATAAA

TTATTAGAAGTTTTAGATGAATATATTGAAGATCCAATTCGTGATGTAGAAAAACCATTTTTAATGCCGGTTG
TTATTAGAAGTTTTAGATGAATATATTGAAGATCCAATTCGTGATGTAGAAAAACCATTTTTAATGCCGGTTG
```

```

AAGGAGTTCATACTATTACTGGTTCGTGGAAGTGTGCTACTGGTTCGTGTAGAAAGAGGAAAAATTAAGATTAG
AAGGAGTTCATACTATTACTGGTTCGTGGAAGTGTGCTACTGGTTCGTGTAGAAAGAGGAAAAATTAAGATTAG

TGAAGAAGTTGAAATTATTGGTTTAAAAAGAACTAAAAAGCTATTATTACTGGTCTTGAAATGTTTAAAAAA
TGAAGAAGTTGAAATTATTGGTTTAAAAAGAACTAAAAAGCTATTATTACTGGTCTTGAAATGTTTAAAAAA

GAATTAGATTTTGCTCAAGCTGGTGATAATGTTGGTATTTTATTACGCGGTATTACTCGTGATCAAATTGAAA
GAATTAGATTTTGCTCAAGCTGGTGATAATGTTGGTATTTTATTACGCGGTATTACTCGTGATCAAATTGAAA

GAGGTCAAGTTTTAGCTAAACCAGGTTCTTTAAATGCTTATCATAAATTTTTGTCTCAAGTTTATATTTTGAC
GAGGTCAAGTTTTAGCTAAACCAGGTTCTTTAAATGCTTATCATAAATTTTTGTCTCAAGTTTATATTTTGAC

TCAACAAGAAGGTGGACGTCATACTGCATTTTTTTCTAATTACAGACCACAATTTTATTTTCGTACTACAGAT
TCAACAAGAAGGTGGACGTCATACTGCATTTTTTTCTAATTACAGACCACAATTTTATTTTCGTACTACAGAT

GTTACTGGTTTTCATTAAATTAAAAAAGATGTTAAATGGTATTACCAGGTGATAGAACAGAACTTATTGTTG
GTTACTGGTTTTCATTAAATTAAAAAAGATGTTAAATGGTATTACCAGGTGATAGAACAGAACTTATTGTTG

AATTAAATCATCCAATCGCTATTGAAGCAGGCACTAAATTTTCTATTTCGTGAAGGTGGACGCACAATAGGAGC
AATTAAATCATCCAATCGCTATTGAAGCAGGCACTAAATTTTCTATTTCGTGAAGGTGGACGCACAATAGGAGC

TGGTACAGTAACTGAAATTATTGAATAA /AAAAAACTCTGTAAAAAATAACAGAGTTTTTTTTTATTCAAT
TGGTACAGTAACTGAAATTATTGAATAA /AAAAAACTCTGTAAAAAATAACAGAGTTTTTTTTTATTCAAT

TTTTTTTTTAATTTATTTGTTTATTTAACCATTCTATAATGTCTAAATTTACTTGTTTATAATCTGAATCATT
TTTTTTTTTAATTTATTTGTTTATTTAACCATTCTATAATGTCTAAATTTACTTGTTTATAATCTGAATCATT

AAATAAATTGTGATCAGAATTTTCATATAATTTTATTTTTTTTATTCACTGCAACTATTGTAAAAAAGTTTGTA
AAATAAATTGTGATCAGAATTTTCATATAATTTTATTTTTTTTATTCACTGCAACTATTGTAAAAAAGTTTGTA

CTATTATCATACGGTACTATTGAATCTTTTTGACCGTGTA
CTATTATCATACGGTACTATTGAATCTTTTTGACCGTGTA
rTUI

```

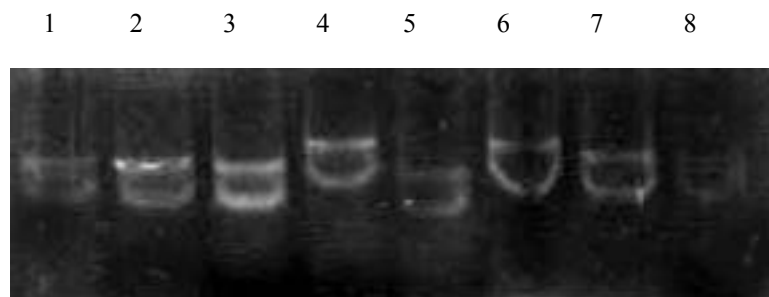
38. ábra. AP fitoplazma *tuf* génjének szekvenciája, fTUB/rTUI primerekkel felszaporítva [felső sor: Berg (1999) által; alsó sor: általunk meghatározott szekvencia]

A reakciókhoz olyan Taq polimerázt használtunk (DyNAzymeEXT, Finnzymes), amely nagy termékek szaporítására alkalmas, valamint a szintézis során szinte egyáltalán nem követ el hibát a 3'→5' ún. proofreading aktivitása miatt. A reakció a következő paraméterek mellett működött a legjobban: 94°C 2 perc; 35 cikluson keresztül: 94°C 30mp, 51°C 45mp, 72°C 90mp; végül 72°C 10 perc.

## 2. A termék klónozása A-T klónozó plazmidba

Az fTUB/rTUI primerekkel felszaporított szakaszt egy A-T klónozó plazmidba, a pGEM-T-be (Promega) ligáltuk. A plazmid előnye, hogy a ligáció sikerességére a transzformációt követően a baktérium kolóniák színéből következtethetünk. Megfelelő táptalajon az inszertet tartalmazó baktériumok fehér, míg az inszertet nem tartalmazó baktériumok kék kolóniákat növesztenek. A fehér kolóniákból plazmidot izoláltunk és a méretüket gél-elektroforézissel ellenőriztük. 46 fehér kolóniából 21-ben volt nagyobb a plazmid a kontrollnál. A méret

alapján pozitív plazmidok inszertjeit először az fTUB/rTUIJ primerekkel ellenőriztük, hogy lássuk teljes-e a beépült szekvencia. A 21 klónból 20-ban kaptuk meg a megfelelő nagyságú szakaszt. Mivel az A-T klónozás nem irányított, így az inszertek irányát két primer párral is ellenőriztük. A forward primer mindkét esetben a plazmidon volt (fT7), a reverse pedig az inszerten (rTER, rTUIJ). Ezek alapján megállapíthattuk, hogy a 20 klónból 7-be épült be jó irányban (39. ábra).



39. ábra. Fehér kolóniák plazmidjának méret szerinti ellenőrzése. 1. 2. 3. minta: inszert nélküli pGEM plazmid, 5. minta: negatív plazmid kontroll, 4. 6. 7. 8. minta: pGE plazmid a beépült *tuf* génnel

Az eredmények alapján kiválasztottuk a legjobbnak ítélt klónt, és meghatároztuk a bázissorrendet a plazmidon levő forward szekvenáló primerrel, amiből láthattuk, hogy az inszert valóban hiba nélkül épült be (40. ábra). Ez azért volt nagyon lényeges, mert a további kísérletekhez csak pontos információk alapján kezdhettünk. Egyetlen bázisnyi eltérés miatt az egész olvasási keret eltolódik, és nem a megfelelő fehérjét kapjuk.

pGEM plazmid . . GAAAGGTTGGAAGATCTGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCCGCG  
GAT\*T/GGAGATTCAAATAAAGATGTCCTAGTAAAGTATTTTTAAGAGATAAAGTGCATGTTA  
AT. . *tuf* gén. . .GTAGGAAGTATTGGTCA. . .pGEM plazmid

40. ábra. AP fitoplazma *tuf* gén pGEM plazmidban

### 3. Restriktációs endonukleáz hasítási helyet tartalmazó primerek tervezése

Az expressziós plazmidba történő szubklónozáshoz olyan primereket terveztünk, amelyeken restriktációs endonukleáz felismerési szekvencia is volt. Elkerülendő a téves kapcsolódást, olyan enzim vágóhelyeket kerestünk a primerekre, amelyek nem voltak rajta a pGEM-T plazmidon, és amelyekkel irányítottan tudtuk behelyezni a gént az expressziós vektorba. A forward primer tervezésénél azt is figyelembe kellett venni, hogy a pQE-40 (QIAGEN) expressziós plazmidban a gén start kódja megfelelő olvasási keretben legyen.



A forward primer (fTUBgl) 5' végének első 7 bázisa a pGEM-T plazmidból származó szekvencia, ezt követi a Bgl II restrikciós vágási hely (6 bázis). Az ezt követő 11 bázis az fTUB primerből származik. A restrikciós helyet azért terveztük a leírt helyre, hogy az fTUB primeren levő A-G gazdag Shine-Dalgarno szakaszt kihagyjuk, hogy ne zavarja az expressziót. Így a 3' és 5' vég pontosan kapcsolódik, a középen levő hasítási helyet pedig (ami nem kapcsolódik) az enzim képes kiegészíteni (41. ábra).

5' GGG ATT G A'GA TCT CAA ATA AAG AT 3'  
 pGEM Bgl II fTUB *tuf* gén start kód

41. ábra. Bgl II hasítási helyet tartalmazó primer

A reverse primer (rTUKpn) első 9 és utolsó 10 bázisa az AP *tuf* gént kódoló szakaszát követő részen található, köztük helyezkedik el a Kpn I vágási hely. (42. ábra).

3' CAC TAG TCT CCA TGG TAT ATT AAA A 5'  
 AP Kpn I AP

42. ábra. KpnI vágási helyet tartalmazó primer

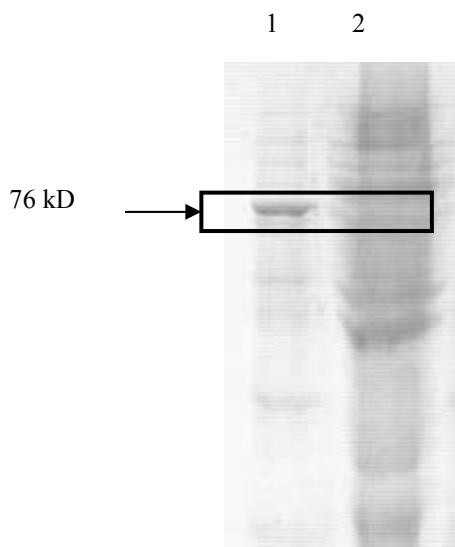
A primerek tervezését és ellenőrzését az 1. pontban leírtak alapján végeztük. A primerek megfelelő annealing értéke 53°C volt. A PCR a következő értékek mellett működött a legjobban: 94°C 2 perc; 35 cikluson keresztül: 94°C 30mp, 53°C 45mp, 72°C 90mp; végül 72°C 10 perc.

#### 4. Szubklónozás expressziós plazmidba

Az fTUBgl/rTUKpn primerekkel felszaporított terméket először egy fenol-kloroformos tisztításnak vetettük alá, majd egy szűrőn a terméket megszabadítottuk a maradék primerektől és oligonukleotidoktól. A hatékony kettős emésztést optimalizáltuk. Olyan puffert használtunk az emésztésekhez, amely mindkét enzim számára minimum 75%-os vágást biztosított (Multi-Core, Promega). Mindkét enzimmel két órán át inkubáltuk a PCR terméket 37°C-on. Mind az első, mind a második restrikciós vágás után inaktiváltuk az enzimeket 10 percen át 80°C-on. A vágott terméket gél-elektroforézissel elválasztottuk, és a megfelelő fragmentet visszavontuk. Ezt ligáltuk az azonos enzimekkel emésztett pQE-40 expressziós

plazmiba. A ligációs terméket ultrakompetens *E.coli* DH5- $\alpha$ -ba transzformáltuk. Ebben a törzsben a transzformáció hatékonysága 95%-os. 25 baktérium kolóniából plazmidot tisztítottunk és nagyságukat gél-elektroforézissel ellenőriztük. 25 esetből 5-ben találtuk nagyobbak a plazmidot a kontrollnál. Ezeket Bgl II-vel és Kpn I-el emésztettük, majd a vágási termékeket agaróz gélen elválasztottuk. Két esetben kaptunk megfelelő nagyságú szakaszt. Ebből a két kolóniából plazmidot vontunk ki és áttettük az *E.coli* M15 törzsbe, amelyben a gén expresszióját szabályozni tudjuk. Ebben a törzsben IPTG hozzáadása nélkül nem expresszálódik a gén. (The QIAexpressionist™ QIAGEN).

A gén expresszióját SDS-PAGE gélen ellenőriztük, fehérje méret marker mellett. A két klón közül egyben kaptunk megfelelő méretű (74 kDa) expresszálódott fehérjét (43. ábra). Ez a fehérje a pQE40 plazmidban eredetileg is benne levő ún. 6HIS-tag (jelölő) és egy DHFR (stabilizáló) fehérjéből (összesen 26kDa) és a *tuf* gén által termelt fehérjéből (48kDa) áll.



43. ábra. A pQE40 expressziós plazmidba épített *tuf* gén által kódolt fehérje expresszálódásának ellenőrzése. 1: az indukálást követően termelődött, összesen 76 kD nagyságú fehérje (a *tuf* gén által kódolt és a DHFR fehérje); 2: az indukálás nélkül termelődött M15 *E.coli* fehérjék

##### 5. Bázissorrend meghatározása, szekvencia elemzése

A pozitív klónból plazmidot vontunk ki és ún. Sephaglas-on (FlexiPrep Kit, Pharmacia Biotech) megtisztítottuk, amely során a szekvenáláshoz megfelelő tisztaságú DNS-t kaptunk. A kapott szekvenciát a várttal összehasonlítottuk. A bázissorrendből láthattuk, hogy a hasított PCR termék az expressziós plazmidba pontosan a tervezett helyre, az olvasási keretbe épült be (44. ábra).

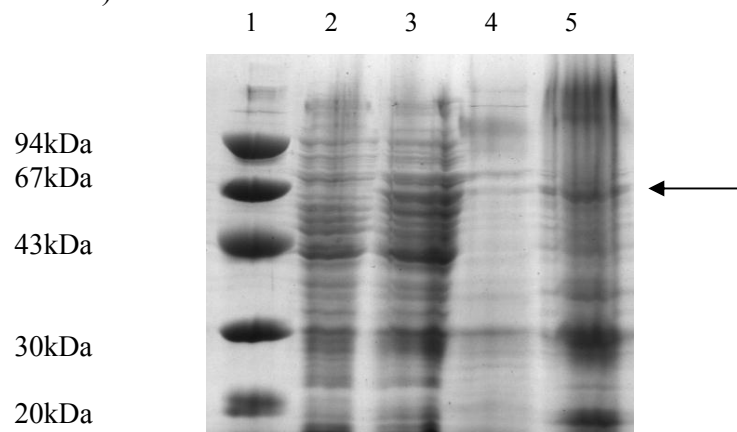
## Bgl II

CC A/GA TCT CAA ATA AAG ATGTCTAGTAAAGTATTTTTAAGAGATAA  
 AGTGCATGTTAATGTAGGAACTATTGGTCATGTTGATCATGGAAAACTACTTTGACTGCTG  
 CTATTACTAAAATTTTATCAACAAAAGGCTTAGCAGAAAAT . . . *tuf* gén

44. ábra. A pontos olvasási keretbe épült *tuf* gén a pQE40 expressziós plazmidban

## 6. Rekombináns fitoplazma fúziós fehérje termeltetés *E.coli*-ban

Először azt vizsgáltuk meg, hogy az expresszáldott fehérje az oldható, vagy a nem oldható fázisban van-e. Ezt az Anyag és módszer 3.5.2. részben leírtak alapján végeztük. A kapott PAGE kép alapján láthattuk, hogy a fehérje láthatóan nagyobb mennyiségben az oldhatatlan fázisban van. (45. ábra).



45. ábra. A termelődött fehérje előfordulási helyének megállapítása. 1.: marker; 2.: kontroll; 3.: indukálást követően termelődött össz-fehérje; 4.: az oldható fázisban és 5.: oldhatatlan fázisban levő fehérjék

## 7. A géntermék tisztítása nagy mennyiségben

A nagy mennyiségben történő tisztításhoz az oldhatatlan fázist használjuk. Jelenleg a fehérjét oszlopkromatográfiás módszerrel próbáljuk nagy mennyiségben tisztítani, amit a későbbiekben első lépésként egerek immunizálásához, majd az így nyert antiszérumot ELISA módszerhez kívánjuk felhasználni.

Újraindítottuk a 60-as évek óta hanyagolt fitoplazma-kutatást és sikerrel adaptáltuk a hazánkban e téren eddig még nem alkalmazott mikroszkópos és molekuláris genetikai módszereket.

Ezekkel az eljárásokkal sikeresen:

- ki tudtuk mutatni a fitoplazma fertőzéseket,
- azonosítani tudtuk a különböző fitoplazma csoportokat már igen alacsony kórokozó koncentráció mellett is,
- ugyanezeket a lehetőségeket kihasználva sort tudtunk keríteni a korábbi években és az általunk felderített fitoplazma csoportok, gazdanövénykörük és a betegségek előfordulási helyeinek összevetésére, illetve egyes esetekben a kiigazításra,
- az említett módszerekkel igazoltan fitoplazma fertőzött növényeken látható tüneteket leírtuk.

A kórokozó egyszerű és a rutinszerű kimutatása érdekében elkezdtek egy monoklonális antiszérum előállítását, amelyet ELISA módszerhez kívánunk felhasználni. A kísérletek során egy fitoplazma gént több lépésben szabályozható promóterű expressziós plazmidba építettük pontos olvasási keretbe és a termelt fehérjét sikeresen elválasztottuk.

Jelenleg a specifikus antigén immunizáláshoz szükséges mennyiségének előállításán dolgozunk.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

### **A Magyarországon előforduló fitoplazmák molekuláris biológiai módszerekkel történő meghatározása és tanulmányozása**

A fitoplazmák sejtfal nélküli, táptalajon nem tenyészthető egysejtű kórokozók.

A fitoplazmákat az 1960-as évek végéig, mint vírusokat tartották számon. A korszerű mikroszkópos és molekuláris genetikai módszereknek köszönhetően ma már számos növényi betegségről tudjuk, hogy fitoplazma okozza. Magyarországon a hatvanas években kialakult sztolbur fertőzéshullám óta nem foglalkoztak érdemben a fitoplazmákkal. Az elmúlt évtizedben a kórokozót növények között terjesztő rovar szervezetek száma megnőtt, és ezt követte a fitoplazmás megbetegedések terjedése is. Ez, és a betegség kezelésének hiánya adja a kutatási téma fontosságát.

Az utóbbi években a már külföldön használt korszerű genetikai módszereket alkalmazva, elkezdtek feltérképezni a Magyarországon előforduló fitoplazma csoportokat és gazdanövénykörüket. A bőséges hazai és nemzetközi irodalomra támaszkodva, a leírt tünetek alapján kezdtük el gyűjteni a fitoplazma fertőzöttségre gyanús növényeket. A tünetek néhány növényfaj és fitoplazma csoport (kajszi, japán szilva – ESFY) esetében nem túlságosan jellegzetesek, időnként könnyen összetéveszthetők egyes vírus, baktérium okozta kórképpel, vagy növényvédőszeres által okozott kárképpel. Általánosságban a tünetekből ugyan következtetni lehet a fitoplazma fertőzöttségre, a kizárólag tünet alapján történő azonosítás azonban kerülendő.

Az elmúlt években a már külföldön használt korszerű genetikai módszereket adaptálva alátámasztottuk, hogy egy esettől eltekintve (repcé) az 1960-70-es években rendelkezésre álló módszerekkel helyesen azonosították a betegségek kórokozóját. A fitoplazmás tüneteket mutató burgonyát, dohányt, csattanó maszlagot, paprikát és paradicsomot valóban a sztolbur fitoplazma károsította, illetve károsítja; a fehér herét pedig a here virágzöldülés (sztolbur?) fitoplazma, amelyet Rainiss (1961) -valószínűleg tévesen- Clover Phyllody-nak nevezett. Horváth a repcén (1969) észlelt virág zöldüléssel betegség kórokozójaként a here törpülés fitoplazmát jelölte meg. A közleményben leírt, és az általunk megfigyelt tünetek fedik egymást. A beteg növényekben molekuláris módszerekkel a sztolbur fitoplazmát azonosítottuk. Az így kapott eredmények arra engednek következtetni, hogy a repcén akkor megtalált betegséget szintén a sztolbur fitoplazma okozhatta. Ma már az is igazoltnak látszik,

hogy a korábban szinte kizárólag baktériumos betegségként értékelt kajszii gutaütéses kórkép kialakulásában nagy jelentősége van a fitoplazma fertőzésnek.

Eddig 24 növényfajon 5 fitoplazma csoportot (AAY, ESFY, AP, CPh és sztolbur) azonosítottunk.

Molekuláris biológiai módszerekkel megerősítettük a sztolbur jelenlétét Magyarországon: paradicsomon, paprikán, csattanó maszlagon, dohányon, repcén és szőlőn.

Elsőként írtuk le Magyarországon: -az ESFY fitoplazmát: kajszin, japán szilván, mandulán

és cseresznyén,

-az AP fitoplazmát: almafán,

-az AAY fitoplazmát: pohánkán, fejeskáposztán, vöröskáposztán, bimbóskelen, kelkáposztán és karfiolon,

-a sztolburt: zelleren, petrezselymen, sárgarépan, pongyola pitypangon és hólyagos habszegfűn,

-a here ellevelesedése fitoplazmát fehér herén.

Elsőként írtuk le a nemzetközi irodalom számára is a sztolbur előfordulását pongyola pitypangon, hólyagos habszegfűn és pohánkán.

A százszorszép fitoplazmás betegségről nem találtunk adatot a hazai és a nemzetközi irodalomban sem, de eddig még nem sikerült a kórokozó fitoplazma csoportját azonosítani.

Az általunk gyűjtött növényminták Békés, Csongrád, Heves, Pest, Szabolcs-Szatmár-Bereg és Zala megyéből származtak. Békés és Csongrád megyében sztolbur fertőzést találtunk paprikán, paradicsomon, petrezselymen, sárgarépan, és zelleren. Heves megyében a paprika és paradicsomtáblákon erős sztolbur fertőzöttséget figyeltünk meg; paprika esetében ez egyes táblákon és fóliasátrakban elérte a 95%-ot. Pest megyében kimutattuk az AAY fitoplazmát bimbóskelen, fejeskáposztán, karfiolon, kelkáposztán, pohánkán és vörös káposztán, az AP-t almafán, az ESFY-t cseresznyén, japán szilván és kajszin, valamint egy eddig még ismeretlen fitoplazma csoportot százszorszépen. Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében dohányon azonosítottuk a sztolbur fitoplazmát. Zala megyében csattanó maszlagon, hólyagos habszegfűn, paradicsomon, paprikán, pongyola pitypangon, repcén, és szőlőn a sztolbur; mandulán az ESFY és fehér herén a here ellevelesedése fitoplazmát azonosítottuk.

A terjedés mértékét, és a kisebb növényvédelmi állomásokon működő laboratóriumok anyagi lehetőségeit figyelembe véve, elkezdtek egy könnyebben és olcsóbban kivitelezhető

kimutatási módszerhez, az ELISA-hoz egy fitoplazma specifikus monoklonális antiszérum előállítását. Ennek segítségével az országba behozott, vagy már bent levő fertőzött oltóanyag kiszűrését célozzuk meg, valamint ezzel együtt a kórokozó terjedésének visszaszorítását.

Elsőként egy fitoplazma génhez; az AP *tuf* génjéhez speciális restrikciós hasítási helyeket tartalmazó indítószekvenciákat terveztünk, amelyekkel sikeresen tudtuk a felszaporított terméket expressziós plazmidba, pontos olvasási keretbe beépíteni.

A sikeres beépítést követően a kívánt fehérjét termeltetni tudtuk, és a fehérje frakciót PAGE gélen elválasztottuk.

Jelenleg a specifikus antigén immunizáláshoz szükséges mennyiségének előállításán dolgozunk, amely végül alkalmas lesz a fitoplazmák szerológiai vizsgálatához.

A jövőben szeretnénk a fitoplazmák gazdanövénykörének és csoportjainak országos szintű felderítését folytatni, és további fitoplazma géneket vizsgálni. Ezzel jobban megismerhetnénk a kórfolyamatot, valamint az ellenük való védekezés lehetőségeit is.

## SUMMARY

### **Molecular biological techniques in the identification and classification of phytoplasma infections occurring in Hungary**

Phytoplasmas are wall-less, non-culturable prokaryotes.

Since the late 1960s, modern microscopic and molecular genetic techniques have shown that many plant diseases that were initially considered virus-associated to be the result of phytoplasma infections. However, in Hungary researchers have not studied these organisms since the end of the big stolbur epidemic in the sixties. In the last decade, with the change in political systems, the use of pesticide decreased significantly; as a result the number of the insect vectors spreading phytoplasmas increased thus increasing the number of infected plants as well. This and the fact that no known cure exists for phytoplasmas underscore the importance of research in this topic.

In the past few years using the latest molecular techniques, we have started a survey of phytoplasma groups and hosts in Hungary. Based on the phytoplasma-related disease symptoms described in both local and foreign literature we have collected plant samples from throughout the country. For several plant species and phytoplasma groups, namely apricot and Japanese plum, and European stone fruit yellows, the disease symptoms can easily be confused with those displayed by viral or bacterial infection. Although one can generally identify a phytoplasma infection based on disease symptoms, molecular evidence is necessary for a definite identification of the origin of the disease.

In the past few years using the latest molecular techniques, we have determined that, with the exception of one case for rape seed, phytoplasmas were properly identified as the causal agent of numerous plant diseases in the 1960s and '70s. Our results have shown that the stolbur phytoplasma was responsible for "stolbur" diseases in tomato, potato, tobacco, pepper and jimsonweed. Rainiss (1961) probably mistakenly identified the Clover "Flower-greening" phytoplasma as clover phyllody. Horváth (1969) identified the causal agent of a rape seed flower phyllody as a clover dwarf phytoplasma. The symptom he describes and those we have found in the field are identical. However our results have shown a stolbur phytoplasma to be associated with the disease; this has led us to believe that stolbur phytoplasma was also responsible for the diseases described by Horváth. Today we can say with some certainty that phytoplasmas play a significant role in an apricot disease known as decline by apoplexy and previously thought to be associated with bacterial infections.



In our survey we have identified 5 phytoplasma groups (AAY, AP, CPh, ESFY and stolbur) on 24 plant species.

Using molecular biological methods we have determined previous identifications of stolbur phytoplasma infections in tomato, pepper, jimsonweed, tobacco and grape to be correct. We have reclassified the causal agent of rape seed as a stolbur phytoplasma.

We are the first to report in Hungary: -ESFY on apricot, almond, Japanese plum and cherry,

-AP on apple,

-AAY on *Fagopyrum dumetorum* and 5 cabbage species,

-stolbur on celery, parsley, carrot, dandelion and bladder campion,

-CPh on clover.

Dandelion and bladder campion were previously unknown natural hosts of the disease in the foreign literature as well. There was one daisy infection for which we could not identify the group of the phytoplasmal-infecting agent.

The plant samples we collected are from the Békés, Csongrád, Heves, Pest, Szabolcs-Szatmár-Bereg and Zala counties. In Békés and Csongrád counties stolbur infections were identified on pepper, tomato, parsley, carrot and celery. In Heves county a strong stolbur infection was observed on pepper and tomato; up to 95% of the pepper in cultivation was infected with the disease on certain fields. In Pest county, phytoplasmas belonging to the AAY group were identified on Brussels sprouts, cabbage, kale, *Fagopyrum dumetorum* and red cabbage, to the AP group on apple, to the ESFY group on cherry, Japanese plum and apricot, and to an as yet unknown group on daisy. In Szabolcs-Szatmár-Bereg county a stolbur infection was identified on tobacco. In Zala county phytoplasmas belonging to the stolbur group were identified on jimsonweed, bladder campion, tomato, pepper, dandelion, rape seed and grape, to the ESFY group on almond, and to the clover phyllody group on white clover..

With the spread of the disease we have started to develop a new phytoplasma specific monoclonal antiserum for a simpler and cheaper detection and identification method (ELISA). We plan to screen infected grafting materials with this antiserum in order to decrease the spread of the pathogen. Currently we are working on the production of the proper amount of antigen for immunization.

Initially we designed an AP *tuf* gene-specific primer with restriction sites, allowing us to ligate the amplified product in the proper frame into an expression vector. Following the ligation, the protein is expressed and isolated on a PAGE gel.

Currently we are working on increasing the level of expression of the antigen to obtain the necessary quantity for the serological examination of phytoplasmas.

In the future we would like to continue the survey of host plants and phytoplasma groups that occur in the country and to study pathogenesis-related phytoplasma genes in more depth. These examinations should give us more information both about pathogenesis and about the possibilities of the protection against phytoplasmas.

## 6. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahrens, U., and Seemüller, E. (1992): Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathol.*, 82: 828-832.
- Ahrens, U., Lorenz, K.H., and Seemüller, E. (1993): Genetic diversity among mycoplasma-like organisms associated with stone fruit disease. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6: 686-691.
- Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., and Arzone, A. (1997): Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol. Biol.*, 6: 115-121.
- Bahnweg, G., Sculze, T., Müller, E.M., Rosenbrock, H., Langebartels, C., and Sandermann, H. (1998): DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark, and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 262: (1) 79-82.
- Beanland, L., Hoy, C.W., Miller, S.A., and Nault, L.B. (1999): Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) transmission of aster yellows phytoplasma: Does gender matter? *Environ. Entomol.*, 28: 1101-1106.
- Berg, M., and Seemüller, E. (1999): Chromosomal organization and nucleotide sequence of the genes coding for the elongation factors G and Tu of the apple proliferation phytoplasma. *Gene*, 226: 103-109.
- Bernet, C., Garret, M., de Barbeyrac, B., Bebear, C., and Bonnet, J. (1989): Detection of *M. pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 2492-2496.
- Bertaccini, A., Davies, R.E., and Lee, I-M. (1992): In vitro micropropagation for maintenance of mycoplasma-like organisms in infected plant tissues. *HortScience*, 27: 1041-1043.
- Bhansali, R., and Ramawat, K.G. (1993): Micropropagation of little leaf diseased eggplants infected with mycoplasma-like organism. *J. Hort. Sci.*, 68: 25-30.
- Bonnet, F., Saillard, C., Kollar, A., Seemüller, E., and Bové, J.M. (1990): Detection and differentiation of the mycoplasma-like organism associated with apple proliferation disease using cloned DNA probes. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5: 438-443.
- Bosco, D., Minucci, C., Boccardo, G., and Conti, M. (1997): Differential acquisition of chrysanthemum yellows phytoplasma by three leafhopper species. *Entomol. Exper. Appl.*, 83: 219-224.
- Bowyer, J.W., Atherton, J.G., Teakle, D.S., and Gabrielle, A. (1969): Mycoplasma-like bodies in plants affected by legume little leaf, tomato big bud and lucerne witches broom disease. *Australian J. Biol. Sci.*, 22: 271-274.
- Braun, E.J., and Sinclair, W.A. (1976): Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. *Phytopathol.*, 66: 598-627.

- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., and Favali, M.A. (1991): Transmission characteristics of the phyllody agent by dodder. *J. Phytopathol.* 133: 15-22.
- Casper, R. (1969): Mycoplasmen als erreger von pflanzenkrankheiten. *Nach. Bl. Dtsch. Pfl. Sch. Dienst (Braunschweig)*, 21: 177-182.
- Catlin, P.B., Olsson, E.A., and Beutel, J.A. (1975): Reduced translocation of carbon and nitrogen from leaves with symptoms of pear. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 100: 184-187.
- Chen, T. A., and Jiang, Y. P. (1988): Monoclonal antibodies against the maize bushy stunt agent. *Can. J. Microbiol.* 34: 6-11.
- Clark, M.F., Morton, A., and Buss, S. L. (1989): Preparation of MLO immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows MLO-associated antigens. *Ann. Appl. Biol.*, 114: 111-124.
- Cousin, M.T., Roux, J., Millet, N., and Michael, M.F. (1990): Maintenance of MLOs (mycoplasma-like organisms) on *Populus alba* micropropagation. *J. Phytopathol.*, 130: 17-23.
- Dale, J.L., and Kim, K.S. (1969): Mycoplasma-like bodies in dodder parasitizing aster yellows-infected plants. *Phytopathol.*, 59: 1765-1766.
- DaRocha, A., Ohki, S.T., and Hiruki, C. (1986): Detection of mycoplasma-like organisms *in situ* by indirect immunofluorescence microscopy. *Phytopathol.*, 76: 864-868.
- Davis, M. J., and Whitcomb, R.F. (1981): Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so called rickettsia-like bacteria). *The Prokaryotes: A Handbook on Habits, Isolation, and Identification of Bacteria*. Heidelberg, Springer-Verlag, 2172-2188.
- Diener, T.O., and Raymer, W.B. (1967): Potato spindle tuber virus: Plant viroid with properties of a free nucleic acid. *Science*, 158: 378-381.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. (1967): Mycoplasma or PLT-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches-broom, aster yellows, or paulownia witches-broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 33: 259-266.
- Douglas, S.M. (1986): Detection of mycoplasma-like organisms in peach and chokecherry with X-disease by fluorescence microscopy. *Phytopathol.*, 76: 784-787.
- Douglas, S. M. (1993): Cytology, histology and histochemistry of MLO infection in tree fruits. *Handbook of Cytology, Histology and Histochemistry of Fruit Tree Diseases*, CRC Press, 253-279.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Life technol. Inc.)*, 12: 13-15.

- Eden-Green, S.J. (1976): Progress of research on lethal yellowing disease. Report of the Research Department Coconut Industry Board Jamaica, 34-41.
- Eden-Green, S.J., and Tully, J.G. (1979): Isolation of *Acholeplasma* spp. from coconut palms affected by lethal yellowing disease in Jamaica. *Curr. Microbiol.*, 2: 311-316.
- Elmendorf, E. (1977): Newly discovered prokaryotic plant pathogens. A bibliography, R 2901 Res. Bull. College Agric., Univ. Wisconsin, Madison, 1-85.
- Esau, K. (1977): Membranous modifications in sieve element plastids of spinach affected by the aster yellows disease. *J. Ultrastruct. Res.*, 59: 87-100.
- Florance, E.R., and Cameron, H.R. (1978): Three dimensional structure and morphology of mycoplasma-like bodies associated with albino disease of *Prunus avium*. *Phytopathol.*, 68: 75-80.
- Fodor, M., Viczián, O., Mergenthaler, E., and Süle, S. (1999): Cabbage infected with phytoplasma from aster yellows. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 34 (1-2): 1-6.
- Gáborjányi, R., és Lönghárd, M. (1967): Adatok a sztolbur vírus magyarországi elterjedéséhez. *Növényvédelem*, 4: 176-180.
- Gáborjányi, R., and Bencsics, M. (1968): Preparation of antiserum against stolbur virus. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.*, 3: 31-33.
- Gáborjányi, R., and Sziráki, I. (1978): Cytokinins in white clover plants infected by clover phyllody mycoplasma. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.*, 13: 33-40.
- Gibb, K.S., Schneider, B., and Padovan, A.C. (1998): Differential detection and relatedness of phytoplasmas in papaya. *Plant Pathol.*, 47: 325-332.
- Golino, D.A. (1989): Experimental hosts of the beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Plant Dis.*, 73: 850-854.
- Goodwin, P.H., Mahuku, G.S., Liu, H., and Xue, B.G. (1999): Monitoring phytoplasma in populations of aster leafhoppers from lettuce fields using the polymerase chain reaction. *Crop prot.*, 18: 91-99.
- Granados, R.R., Maramorosch, K., and Shikata, E. (1968): Mycoplasma: suspected etiologic agent of corn stunt. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 60: 841-844.
- Griffiths, H.M., Sinclair, W.A., Davis, R.E., Lee, I-M., Dally, E.L., Guo, H., Chen, T.A., and Hibben, C.R. (1994): Characterization of mycoplasma-like organisms from *Fraxinus*, *Syringa*, and associated plants from geographically diverse sites. *Phytopathol.*, 84: 119-126.
- Grittiths, H.M., Gundersen, U.E., Sinclair, N.A., Lee, I-M., and Davis, R.E. (1999): Mycoplasma-like organisms from milkweed, goldenrod- and spirea represent two new 16S rRNA sub-groups and three new strain sub-clusters related to peach X-disease. *Canadian J. Plant Pathol.*, 16: 55-66.

- Gundersen, D.F., Lee, I-M., Rehner, S.A., Davis, R.E., and Kingsbury, D.T. (1994): Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas), a basis for their classification. *J. Bacteriol.*, 176: 5244-5254.
- Gundersen, D.E., Lee, I-M., Schaff, D.A., Harrison, N.A., Chang, C.J., Davis, R.E., and Kingsbury, D.T. (1996): Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in the 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 64-75.
- Guthrie, J.N., Walsh, K.B., Scott, P.T., and Rasmussen, T.S. (2001): The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 58: 23-30.
- Haggis, G. H., and Sinha, R. C. (1978): Scanning electron microscopy of mycoplasma like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathol.*, 68: 677-680.
- Harasawa, R., Koshimizu, K., Uemori, T., Takeda, O., Asada, K., and Kato, I. (1990): The polymerase chain reaction for *Mycoplasma pneumoniae*. *Microb. Immunol.*, 34: 393-395.
- Harasawa, R., Koshimizu, K., Taketa, O., Uemori, T., Asada, K., and Kato, I. (1991): Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, 5: 103-109.
- Harrison, N.A., Tsai, J.H., Bourne, C.M., and Richardson, P.A. (1991): Molecular cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA of mycoplasma-like organisms associated with witches-broom disease of pigeon pea in Florida. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4: 300-307.
- Harrison, N.A., Bourne, C.M., Cox, R.L., Tsai, J.H., and Richardson, P.A. (1992): DNA probes for detection of mycoplasma-like organisms associated with lethal yellowing disease of palms in Florida. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 82: 216-224.
- Harrison, N.A., Richardson, P.A., and Tsai, J.H. (1996): PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Dis.*, 80: 263-269.
- Hibben, C.R., and Wolansky, B. (1970): Dodder transmission of a mycoplasma from ash trees with yellows type symptoms. *Phytopathol.*, 60: p. 1295.
- Hibino, H., and Schneider, H. (1970): Mycoplasma-like bodies in sieve tubes of pear trees affected with pear decline. *Phytopathol.*, 60: 499-501.
- Hiruki, C. (1988): Rapid and specific detection methods for plant mycoplasmas. *Mycoplasma Diseases of Crops*, Eds., Springer-Verlag, New York, 51.
- Hirumi, H., and Maramorosch, K. (1973): Ultrastructure of the aster yellows agent: mycoplasma-like bodies in sieve tube elements of *Nicotiana rustica*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 225: 201.

- Horváth, J. (1969): Green petal - a new disease of rape in Hungary. *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.*, 4: 363-367.
- Horváth, J. (1970): Properties of mycoplasmas causing yellowing type plant diseases and the plant mycoplasmoses. *Növénytermelés*, 19: 327-337.
- Horváth, J. (1972): *Növényvírusok, vektorok, vírusátvitel*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 285-293.
- Hosford, R.M. (1968): Transmission of plant viruses by dodder. *Botanical Review*, 33: 387-406.
- Hsu, H.T., Lee, I-M., Davis, R.E., and Wang, Y.C. (1990): Immunization for generation of hybridoma antibodies specifically reacting with plants infected with a mycoplasma-like organism (MLO) and their use in detection of MLO antigens. *Phytopathol.*, 80: 946-950.
- Hull, R. (1971): Mycoplasma-like organisms in plants. *Rev. Plant Pathol.*, 50: 121-130.
- Jarausch, W., Lansac, M., and Dosba, F. (1994): Micropropagation for maintenance of mycoplasma-like organisms in infected Prunus Marianna GF 8-1. *Acta Hortic.*, 359: 169-176.
- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., and Bové, J-M. (1994): Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl. Envir. Microbiol.*, 60: 2916-2923.
- Jiang, Y.P., Che, T.A., Chiykowski, L.N., and Sinha, R.C. (1989): Production of monoclonal antibodies to peach eastern X-disease agent and their use in disease detection. *Can. J. Plant Pathol.*, 11: 325-331.
- Jones, A.L., Whitcomb, R.I., Williamson, D.L., and Coan, M.E. (1977): Comparative growth and primary isolation of spiroplasmas in media based on insect tissue culture formulations. *Phytopathol.*, 67: 738-746.
- Kenyon, L., Harrison, N.A., Ashburner, G.R., Boa, E., and Richardson, P.A. (1998): Detection of a pigeon pea witches-broom-related phytoplasma in trees of *Gliricidia sepium* affected by little-leaf disease in Central America. *Plant Pathol.*, 47: 671-680.
- Kirkpatrick, B. C., and Fraser, J.D. (1989): Phylogenetic relationships of the Western X-disease mycoplasma-like organism (X-MLO) as established by 16S rRNA sequence. *Phytopathol.*, 79: 133-138.
- Kirkpatrick, B.C., Fisher, G.A., Fraser, J.D., and Purcell, A.H. (1990): Epidemiological and phylogenetic studies on Western X-disease mycoplasma-like organism. *Zbl. Bakt. Suppl.*, 20: 287-297.
- Kirkpatrick, B.C. (1992): *Mycoplasma-like organisms, Plant and Invertebrate Pathogens. Prokaryotes*, eds. Springer-Verlag, New York, USA, 4050-4067.

Kirkpatrick, B.C., Gao, J., and Harrison, N.A. (1992): Phylogenetic relationships of 15 MLOs established by PCR sequencing of variable regions within the 16S ribosomal RNA gene. *Phytopathol.*, 82: 1083-1093.

Kirkpatrick, B.C., Smart, C., Gardner, S., Gao, J.L., Ahrens, U., Maurer, R., Schneider, B., Lorenz, K.H., Seemüller, E., Harrison, N., Namba, S., and Daire, X. (1994): Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Letters*, 3: 228-229.

Kirkpatrick, B.C., and Smart, C.D. (1995): Phytoplasmas: can phylogeny provide the means to understand pathogenicity. *Advances in Botanical Res.* eds. Academic Press, 187-212.

Kison, H., Schneider, B., and Seemüller, E. (1994): Restriction fragment length polymorphism within the apple proliferation mycoplasma-like organism. *J. Phytopathol.*, 141: 395-401.

Kison, H., Kirkpatrick, B.C., and Seemüller, E. (1997): Genetic comparison of the peach yellow leaf roll agent with European fruit tree phytoplasmas of the apple proliferation group. *Plant Pathol.*, 46: 538-544.

Kollar, A., Seemüller, E., and Krczal, G. (1989): Impairment of the sieve tube sealing mechanism of trees infected by mycoplasma-like organisms. *J. Phytopath.*, 124: 7-12.

Kollar, A., Seemüller, E., Bonnet, F., Saillard, C., and Bové, J.M. (1990): Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathol.*, 80: 233-237.

Kollar, A., and Seemüller, E. (1990): Chemical comparison of phloem exudate of mycoplasma-infected apple trees. *J. Phytopath.*, 126: 99-111.

Kuroli, G. (1970a): Antibiotikus védekezési kísérletek eredményei a sztolburbetegséggel fertőzött paradicsomnövényeken. *A növényvéd. korsz. kérd.*, 4: 19-30.

Kuroli, G. (1970b): Adatok a sztolburt terjesztő sárgalábú recéskabóca (*Hyalesthes obsoletus* Sign.) biológiájához. *Agrártudományi Egyetem Mosonmagyaróvári Mezőgazdaságtud. Kar Közleményei*, 6: 5-22

Kuske, C.R., and Kirkpatrick, B.C. (1992): Phylogenetic relationships between the western aster yellows a mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 226-233.

Lee, I-M., and Davis, R.F. (1992a): Mycoplasmas which infect plants and insects. *Mycoplasmas; Molecular Biology and Pathogenesis*, eds. American Society for Microbiology, Washington, USA, 379-390.

Lee, I-M., Davis, R.F., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C., and Schaff, D. (1992b): A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows ML0 strain cluster. *Phytopathol.*, 82: 977-986.



- Lee, I-M., Gundersen, D.E., Davis, R.E., and Chiykowski, L.N. (1992): Identification and analysis of a genomic strain cluster of mycoplasma-like organisms associated with canadian peach (eastern) X-disease, Western X-disease and clover yellow edge. *J. Bacteriol.*, 174: 6694-6698.
- Lee, I-M., Davis, R. E., and Hsu, H.T. (1993): Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasma-like organism strain cluster by serological assay with monoclonal antibodies. *Plant Dis.*, 77: 815-817.
- Lee, I-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., and Gundersen, D.E. (1993): Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathol.*, 83: 834-842.
- Lee, I-M., Gundersen, D.F., Rindal, D.E., Davis, R.E., and Rartoszyk, I-M. (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48: 1153-1169.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., and Seemüller, E. (1999): Effect of phytoplasma infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55: 59-68.
- Lin, C.P., and Chen, T.A. (1986): Comparison of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies in detection of the aster yellows mycoplasma-like organisms. *Phytopathol.*, 76: 45-50.
- Lim, P.O., and Sears, B.B. (1989): 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.*, 171: 5901-5906.
- Lim, P.O., and Sears, B.B. (1992): Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J. Bacteriol.*, 174: 2606-2611.
- Maixner, M., Ahrens, U., and Seemüller, E. (1995): Detection of the German grapevine yellows (Vergilbunkskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Europ. J. Plant Pathol.*, 101: 244-250.
- Malinowski, T., Zandarski, J., Komorowska, B., and Zawadzka, B. (1996): Application of DAPI staining and PCR amplification of DNA for the identification of pear decline phytoplasma in declining trees in Poland. *Phytopathol. Pol.*, XII: 103-110.
- Maramorosch, K., Shikata, E., and Granados, R.R. (1968): Structures-resembling mycoplasma in diseased plants and in insect vectors. *Trans. NY Acad. Sci.*, 30: 541-555.
- Maramorosch, K., Granados, R.R., and Hirumi, H. (1970): Mycoplasma diseases of plants and insects. *Adv. Virus Res.*, 16: 135-193.
- Maramorosch, K. (1974): Mycoplasmas and rickettsias in relation to plant diseases. *Ann. Rev. Microbiol.*, 28: 301-324.

- Maramorosch, K. (1976): Plant Mycoplasma Diseases. *Encyclopedia of Plant Physiology*, eds. Springer, 150-171.
- Maramorosch, K. (1979): Aster yellows spiroplasma ATCC 29747. Abstracts 79<sup>th</sup> Annu. Meeting Amer. Soc. Microbiol., 85.
- Marcone, C., Ragozzino, A., and Seemüller, E. (1997): Detection and identification of phytoplasmas in yellow-diseased weeds in Italy. *Plant Pathol.*, 46: 530-532.
- Marwitz, R., and Petzold, H. (1978): Examination of mycoplasma-like organisms in yellows diseased plants by scanning electron microscope. 3<sup>rd</sup> Int. Congress of Plant Pathol., München 16-23 Aug., 78.
- Marwitz, R. (1990): Diversity of yellows disease agents in plant infections. *Zbl. Bakt. Suppl.*, 20: 431-434.
- McCoy, R. E. (1979): Mycoplasmas and Yellows Disease, *The Mycoplasmas*, Vol. 3. Academic Press, New York, 229.
- McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Cousin, M.T., Dale, J.L., deLeruw, G.T.N., Golino, D.A., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.H., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yang, I.L., Zhu, B.M., and Seemüller, E. (1989): Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. *Spiroplasmas, Achleplasmas and Mycoplasmas of plants and Arthropods*. Academic Press, San Diego CA., 345-640.
- Metcalf, Z. P. (1927-71): General catalogue of the Homoptera. Agric. Res. Service, US Department of Agriculture, Washington D. C.
- Milinkó, I., Sáringer, Gy., Gáborjányi, R. és Kuroli, G. (1966): Adatok a sztolbur vírus elterjedésére és leküzdésére. XVI. Növényvéd. Tud. Ért., Budapest, 30: 1-7.
- Mouches, C., Candresse, T., McGarrity, G.J., and Bove, J.M. (1983): Analysis of spiroplasma proteins contribution to the taxonomy of group IV spiroplasma protein antigen. *Yale J. Biol. Med.*, 56: 451.
- Murral, D.J., Nault, C., Hoy, W., Madden, L.V., and Miller, S.A. (1996): Effect of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.*, 89: 1223-1232.
- Müller, H.M., Kleinhempel, H., Rabitschuch, A.W., Spaar, D., and Müller, J.H. (1975): Mykoplasmen in der Phytopathologie. Bibliographisches Verzeichnis der Literatur für die Jahre Inst. für Landwirtschaftliche Information und Dokumentation, Berlin, 1967-1974.
- Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S., and Tsuchizaki, T. (1993): Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 461-467.

- Nasu, S., Sugiura, M., Wakimoto, T., and Gda, T.T. (1967): On the pathogen of rice yellow dwarf virus. *Ann. Phytopathol. Soc.*, 33: 343-344.
- Németh, M., Ember, I., Krizbai, L., Kölber, M., Hangyál, R. and Voigt, E. (2000): Detection and identification of phytoplasmas in peach based on woody indexing and molecular methods. *Int. J. Hort. Sci.* (in press).
- Némethy, Zs., Orosz, A. és Süle, S. (2001): Szabadföldi dísznövények fitoplazmás betegségei. 47. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 2001.
- Parthasarathy, M.V. (1974): Mycoplasma-like organisms associated with lethal disease of palms. *Phytopathol.*, 64: 667- 674.
- Pertot, I., Musetti, R., Pressacco, L., and Osler, R. (1998): Changes in indole-3-acetic acid level in microscopic tissues of *Catharanthus roseus* infected by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios*, 95: 13-23.
- Petróczy, I. (1958): A dohány sztolburos megbetegedése hazánkban, kórképének változékonysága az ökológiai tényezőkkel való összefüggésben. *Mezőgazdaságtudományi Kar Közl. Mg. Kiadó*, Budapest, 357-368.
- Petróczy, I. (1962): Sztolbur és sztolburhoz hasonló megbetegedések nyugatmagyarországi burgonyatermesztő vidékeinken. *Növénytermelés*, 2: 183-190.
- Petróczy, I. (1965): Jelentés a dohány sztolburbetegségének hazai megjelenéséről. *Dohányipar*, nov.-dec., 12-13.
- Ploaie, P.G. (1971): Particles resembling viruses associated with mycoplasma-like organism in plants. *Rev. Roum. Biol. Botanique*, 16: 3~6.
- Ploaie, P. G. (1973): Rickettsia-like bodies associated with plant cells. *Rev. Roum. Virol.*, 10: 319-320.
- Ploaie, P.G. (1981): Mycoplasma-like organisms and plant diseases in Europe. *Plant Diseases and Vectors*, 3. Acad. Press, 61-104.
- Rainiss, L. (1961): A virágzöldülés mint új vírusos jelenség a fehérherében. *A növényvédelem időszerű kérdései*, 2: 16-21.
- Salazar, L., and Javasinghe, U. (2001): Diseases caused by phytoplasmas in potato. International Potato Center (CIP). *Techniques in Plant Virology*,. Training Manual. Lima, Peru (The book is under edition).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning. *Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1: 44-45.
- Samuel, G., Bald, J.G., and Eardly, C.M. (1933): "Big bud", a virus disease of the tomato. *Phytopathol.*, 23: 641-652.

Schlag, M.G., and Gal, M. (1996): The nacreous sieve-element wall in healthy and in MLO-infected apple trees. *J. Plant Sci.*, 157: 80-91.

Schneider, H. (1973): Cytological and histological aberrations in woody plants following infections with viruses, mycoplasmas, rickettsias and flagellates. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 11: 119-146.

Schneider, H. (1977): Indicator hosts for pear decline: Symptomatology, histopathology and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. *Phytopathol.*, 67: 592-601.

Schneider, R., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C., and Seemüller, E. (1993): Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organism using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S DNA. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 419-527.

Schneider, R., and Seemüller, E. (1994): Studies on the taxonomic relationships of mycoplasma-like organisms by Southern blot analysis. *J. Phytopathol.*, 141: 173-185.

Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., and Kirkpatrick, B.C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, eds. Academic Press. San Diego, USA, 369-380.

Schneider, B., Marcone, C., Kampmann, M., Ragozzino, A., Lederer, W., Cousin, M.T., and Seemüller, E. (1997): Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *Eur. J. Plant Pathol.*, 103: 675-686.

Sears, B.B., and Klomparens, K.L. (1989): Leaf tip cultures of the evening primrose allow stable, aseptic culture of mycoplasma-like organism. *Can. J. Plant Pathol.*, 11: 343-348.

Sears, R., Band, B., and Kirkpatrick, C. (1994): Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *American Society for Microbiology News*, 60: 307-312.

Seemüller, E. (1976): Demonstration of mycoplasma-like organisms in the phloem of trees with pear decline or proliferation symptoms by fluorescence microscopy? *J. Phytopathol.*, 85: 368-372.

Seemüller, E. (1976): Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Hort.*, 67: 109-112.

Seemüller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B.B., and Stackebrandt, E. (1994): Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 440-446.

Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., and Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.*, 80: 3-26.

- Shepardson, S., and McCrum, R.C. (1979): Effect of gibberellic acid on mycoplasma-like organism-infected and healthy periwinkle. *Plant Dis. Rep.*, 63: 865-869.
- Shikata, E., Maramorosch, K., and Ling, K. C. (1969): Presumptive mycoplasma etiology of yellows diseases. *FAO Plant Prot. Bull.*, 10: 121-128.
- Sinclair, W.A., Griffiths, H.M., and Davis, R.E. (1996): Ash yellows and lilac witches-broom: phytoplasmal diseases of concern in forestry and horticulture. *Plant Dis.*, 80: 468-475.
- Süle, S., Viczián, O., és Péntzes, B. (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása. *Kertészet és Szőlészet*, 45 évf., 8-11.
- Szirmai, J. (1956): Új vírubetegség hazánkban. *Agrártudomány*, 8: 351-354.
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H.O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., and Yokoyama, K. (1994): The optimization of preparation of competent cells for transformation of *E.coli*. *Nucleic Acids Res.*, 14: 2857-2858.
- Toth, K.P., Harrison, K., and Sears, B.R. (1994): Phylogenetic relationships among members of the class Mollicutes deduced from *rps3* gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 119-124.
- Ulrichova, M., and Petru, E. (1975): Elimination of mycoplasma in tobacco callus tissues (*Nicotiana glauca* Grah) cultured in vitro in the presence of 2,4-D nutrient medium. *Biologia Plantarum*, 17: 103-108.
- Valenta, V., Musil, M., and Misiga, S. (1961): Investigations on European yellow-type viruses. *Phytopathol.*, 42: 1-38.
- Varga, K., Kölber, M., Erdős, Z., Bíró, E., Paltrinieri, S., Martini, M. and Bertaccini, A. (2001): Identification of phytoplasmas infecting sour cherry in Hungary. *Acta Hort.* ISHS, 2: 383-388.
- Viczián, O., Süle, S., Péntzes, B., és Seemüller, E. (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. *Új Kertgazdaság*, (1): 48-51.
- Viczián, O., Süle, S., and Gáborjányi, R. (1998): Detection and identification of stolbur phytoplasma in Hungary by PCR and RFLP methods. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.*, 33 (3-4): 255-260.
- Waters, H., and Hunt, P. (1980): The in vivo three-dimensional form of a plant mycoplasma-like organism by the analysis of serial ultrathin sections. *J. Gen. Microbiol.*, 116: p. 111.
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Erten, J., Maniloff, J., Woese, C.R. (1989): A phylogenetic analysis of the mycoplasmas, basis for their classification. *J. Bacteriol.*, 171: 6455-6467.

Whitcomb, R. P., and Davis, R.E. (1970): Mycoplasma and phytarboviruses as plant pathogens persistently transmitted by insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 15: 405-464.

Whitcomb, R.F., and Tully, J.G. (1979): *The Mycoplasmas III*. Academic Press, New York.

Woese, C.R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51: 221-271.

## 1. Melléklet

### A dolgozathoz kapcsolódó közlemények:

#### Cikkek:

1. **Viczián, O., Süle, S., Péntes, B. és Seemüller, E.** (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. Új Kertgazdaság, (1): 48-51.
2. **Viczián O., Süle S. és Gáborjányi, R.** (1998): A sztolbur fitoplazma természetes gazdanövényei Magyarországon. Növényvédelem, 34 (11): 617-620.
3. **Viczián, O., Süle, S., and Gáborjányi, R.** (1998): Detection and identification of stolbur Phytoplasma in Hungary by PCR and RFLP methods. Acta Phytopathol. Entomol. Hung., 33 (3-4): 255-260.
4. **Fodor, M., Viczián, O., Mergenthaler, E., and Süle, S.** (1999): Cabbage Infected with Phytoplasma from Aster Yellows. Acta Phytopathol. Entomol. Hung., 34 (1-2): 1-6.

#### Ismeretterjesztő cikk:

1. **Süle, S., Viczián, O. és Péntes, B.** (1997): A kajszi fitoplazmás pusztulása. Kertészet és Szőlészet, 45: 8-11.
2. **Viczián, O., Süle, S. és Gáborjányi, R.** (1998): Fűben-fában fitoplazma. Élet és Tudomány, LIII (16): 491-493.
3. **V. Németh, M., Kölber, M., Hangyál, R., Süle, S., Viczián, O., Mergenthaler, E. és Fodor, M.** (2000): Csonthéjasok fitoplazmás pusztulása Magyarországon. Agrofórum, 11 (13): 26-32.

#### Előadások és posztterek:

1. **Süle S., Viczián O., Orosz A. és Tóbiás I.** A sztolbur betegség ismét megjelent Magyarországon. 42. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 137.o., 1996.
2. **Viczián O. és Süle S.** A csonthéjas gyümölcsfák fitoplazmáinak PCR-el történő meghatározása. 42. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 140. o., 1996.
3. **Viczián O. és Süle S.** A kajszi fitoplazmás pusztulása Magyarországon. "Lippay János" Tudományos Ülésszak, Budapest, 324-325., 1996.

4. **Viczián O., Süle S. és Gáborjányi R.** A szőlő sztolbur-betegség járványtani kérdései. "Integrált növényvédelem a szőlőben" c. Tud. Ülészak, Pécsi Akadémiai Bizottság Növényorvosi és Kertészeti Munkabizottsága, Pécs, 1998.
5. **Viczián O., Süle S. és Gáborjányi R.** Fitoplazmás betegségek Magyarországon. 44. Növényvédelmi Tud. Napok, Budapest, 1998.
6. **Viczián O., Süle S. és Gáborjányi R.** A sztolbur fitoplazma természetes gazdanövényei Magyarországon. "Lippay János-Vas Károly" Tud. Ülésszak, IX. Budapest, 348-349., 1998.
7. **Viczián O., Mergenthaler E., Fodor M. és Süle S.** Fitoplazma gének izolálása antiszérum termelés céljából. 46. Növényvédelmi Tud. napok. Budapest, 2000.
8. **Fodor M., Viczián O., Mergenthaler E. és Süle S.** Újabb adatok a hazai fitoplazma fertőzésekről. 46. Növényvédelmi Tud. Napok. Budapest, 2000.
9. **Mergenthaler, E., Viczián, O., Fodor, M., and Süle, S.** Isolation and expression of an immunodominant membrane protein gene of the ESFY phytoplasma for antiserum production. Proceedings of the 18<sup>th</sup> International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops, Acta Horticult., 550 (2): 355-360. 2001.

#### **Egyéb közlemények**

**Mozsár, J. and Viczián, O.** (1996): Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. *Vitis*, 35 (4): 155-157.

**Mozsár, J., Viczián, O., and Süle, S.** (1998): Agrobacterium-mediated transformation of an interspecific grapevine. *Vitis*, 37 (3): 127-130.

**Kehm, R., Jakob, N. J., Welzel, T. M., Tobiasch, E., Viczian, O., Jock, S., Geider, K., Süle, S., and Darai, G.** (2001): Expression of immunogenic puumala virus nucleocapsid protein in transgenic tobacco and potato plants. *Virus Genes*, 22 (1): 73-83.

**Mozsár, J., Mergenthaler, E., Viczián, O., and Süle, S.** A szőlő poligalakturonáz-inhibitor tartalma és *Agrobacterium vitis*-szel szembeni ellenállósága. 44. Növényvédelmi Tud. Napok., Budapest, 1998.

**Mozsár, J., Süle, S. és Viczián, O.** Transzgenikus szőlő előállítása agrobaktériumos transzformációval. IV. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 1998.



## 2. Melléklet

### Ábrajegyzék

	oldalszám
1.ábra. A fitoplazmák jelenlegi rendszertani besorolása	12
2.ábra. Egészséges fejes káposzta hosszanti metszete	38
3.ábra. AAY-val fertőzött fejes káposzta hosszanti metszete	38
4.ábra. AAY-val fertőzött fejes káposzta torzult, lefele kanalasodó levelei	38
5.ábra. AAY-val fertőzött vörös káposzta	38
6.ábra. AAY-val fertőzött kelkáposzta	40
7.ábra. AAY-val fertőzött bimbóskele	40
8.ábra. AAY-val fertőzött pohánka	40
9.ábra. Sztolburos paprikapalánta (balra), deformálódott, apró paprika (jobbra fent) és foltokban előforduló sztolbur fertőzés egy paprikatáblában (jobbra lent)	41
10.ábra. Sztolburos paradicsom hajtásvége (balra), tipikus sztolburos virág (jobbra)	41
11.ábra. A sztolbur fertőzés egyes fázisai zelleren	44
12.ábra. Sztolburos sárgarépa leveleinek elszíneződése a betegség előrehaladtával	44
13.ábra. Sztolburos szőlő elszíneződött levelei	44
14.ábra. Egészséges (balra) és sztolburos (jobbra) repce virágzata	44
15.ábra. Sztolburos dohány virágzata	45
16.ábra. Sztolburos hólyagos habszegfű virága	45
17.ábra. Sztolburos pongyola pitypang virága	45
18.ábra. ESFY-val fertőzött kajszi kanalasodó levelei	46
19.ábra. ESFY-val fertőzött kajszi látható általános sárgulás	46
20.ábra. Tipikus kép egy idős ESFY-val fertőzött kajsziról	46
21.ábra. Egész lombozatra kiterjedt sárgulás	46
22.ábra. ESFY-val fertőzött japán szilva	48
23.ábra. Az elszáradt japán szilva kihajtott alanya	48
24.ábra. Egészséges és ESFY-val fertőzött cseresznye levél	48
25.ábra. Pusztuló, ESFY-val fertőzött cseresznyefa	48
26.ábra. ESFY-val fertőzött mandulafa	48
27.ábra. Egészséges (balra) és AP-val fertőzött (jobbra) almafa levelei	49
28.ábra. Egészséges (balra) és CPh-val fertőzött (jobbra) here virága	49
29.ábra. Elleveledett, CPh-val fertőzött herevirág	49
30.ábra. Fitoplazma fertőzött százszorszép deformálódott virága	49
31.ábra. Festődött fitoplazma DNS	50
32.ábra. Fitoplazma fertőzés megállapítása dot blot módszerrel	52
33.ábra. rP1/fP7 primerekkel felszaporított ESFY (3), AP (4), AAY (5) és sztolbur (6) fitoplazma DNS. Az 1., 2. és 7. minták egészséges kontrollak, M=marker	54
34.ábra. fP1/rP7 primerekkel felszaporított fitoplazma DNS hasítási képe. Az emésztés AluI restrikciós endonukleázzal történt. Marker méretek 1-8-ig: 621, 521, 257, 215, 159, 100, 66 és 42bp	54
35.ábra. A Magyarországon talált fitoplazmák eddig feltérképezett előfordulási helyei	57
36.ábra. Egészséges (bal felső), AP (jobb) és AAY (bal alsó) fertőzött rózsameténg virága	58
37.ábra. Pozitív plakk (balra) felszaporítva (jobbra)	60

- 38.ábra. AP fitoplazma *tuf* génjének szekvenciája, fTUB/rTUI primerekkel 63  
felszaporítva
- 39.ábra. Fehér kolóniák plazmidjának méret szerinti ellenőrzése: 1. 2. 3. minta: 64  
inszert nélküli pGEM plazmid, 5. minta: negatív plazmid kontroll, 4. 6. 7.  
8. minta: pGEM plazmid a beépült *tuf* génnel
- 40.ábra. AP fitoplazma *tuf* gén pGEM plazmidban 64
- 41.ábra. Bgl II hasítási helyet tartalmazó primer 65
- 42.ábra. KpnI vágási helyet tartalmazó primer 65
- 43.ábra. A pQE40 expressziós plazmidba épített *tuf* gén által kódolt fehérje 66  
expresszáldásának ellenőrzése. 1: az indukálást követően termelődött,  
összesen 76 kD nagyságú fehérje (a *tuf* gén által kódolt és a DHFR  
fehérje); 2: az indukálás nélkül termelődött M15 *E.coli* fehérjék
- 44.ábra. A pontos olvasási keretbe épült *tuf* gén a pQE40 expressziós plazmidban 67
- 45.ábra. A termelődött fehérje előfordulási helyének megállapítása. 1.: marker; 2.: 67  
kontroll; 3.: indukálást követően termelődött össz-fehérje; 4.: az oldható  
fázisban és 5.: oldhatatlan fázisban levő fehérjék

### 3. Melléklet

#### A fitoplazmák jelenlegi besorolása.

Subgroup <sup>1</sup>	Strain/phytoplasma acronym(s)	Evidence of identity or similarity <sup>2</sup>	Disease	Plant or insect host	Geographic area	Selected references
I-A						
Tomato big bud phytoplasma	BB	FS, rRFLP, cRFLP, S	Tomato big bud	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	Arkansas	Lee <i>et al.</i> , 1992a, 1993a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-A	OKAY1, NJAY, EAY	rRFLP, cRFLP, S	Aster yellows	<i>Lactuca sativa</i> (lettuce)	North America	Lee <i>et al.</i> , 1993a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-A	AY27	rRFLP, cRFLP, S	Alberta aster yellows	<i>Callistephus chinensis</i> (China aster)	Canada	Lee <i>et al.</i> , 1992a, 1993a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-A	CNI	rRFLP, cRFLP, S	Periwinkle little leaf	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	USA	Lee <i>et al.</i> , 1992a, 1993a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-A		rRFLP	Purple coneflower yellows	<i>Echinacea purpurea</i> (purple coneflower)	Wisconsin	Stanosz <i>et al.</i> , 1997
I-A	GD1	rRFLP, S	Dogwood stunt	<i>Cornus racemosa</i> (gray dogwood)	New York State	Griffiths <i>et al.</i> , 1994a
I-A	ErY4	rRFLP	Erigeron yellows	<i>Erigeron canadensis</i> (horseweed)	Maryland	Lee <i>et al.</i> , 1994
I-A	GS1	rRFLP	Goldenrod stunt	<i>Solidago</i> spp. (goldenrod)	Maryland	Lee <i>et al.</i> , 1994
I-A (rr-tp)		rRFLP	Multipier disease	<i>Fragaria x ananassa</i> (strawberry)	Florida	Harrison <i>et al.</i> , 1997
I-B						
Maryland aster yellows phytoplasma	AY1	FS, rRFLP, cRFLP	Maryland aster yellows	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	Maryland	Lee <i>et al.</i> , 1992a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-B	DAY	rRFLP, cRFLP	Dwarf western aster yellows	<i>Trifolium</i> sp. (clover)	California	Kuske <i>et al.</i> , 1991; Lee <i>et al.</i> , 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-B	TLAY2	rRFLP, cRFLP	Tulelake western aster yellows	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	California	Lee <i>et al.</i> , 1992a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-B	OKAY3	rRFLP, cRFLP	Western aster yellows	<i>Daucus carota</i> (carrot)	Oklahoma	Lee <i>et al.</i> , 1992a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-B	CY2, MY	rRFLP, cRFLP	Marguerite yellows	<i>Chrysanthemum frutescens</i> (marguerite)	Japan, Italy	Gundersen <i>et al.</i> , 1996; Vibio <i>et al.</i> , 1996; Okuda <i>et al.</i> , 1997
I-B	SL5, SL7, SL8, FPV	rRFLP	Periwinkle yellows	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	USA	Lee <i>et al.</i> , 1993c; Harrison <i>et al.</i> , 1996
I-B	IPWB, SL1, SIPY, IPS, FE1	rRFLP, cRFLP	Periwinkle witches' broom and virescence	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	Italy	Vibio <i>et al.</i> , 1996; Marcone <i>et al.</i> , 1997b
I-B	NYAY	rRFLP, cRFLP	New York aster yellows	<i>Lactuca sativa</i> (lettuce)	New York	Lee <i>et al.</i> , 1992a, 1993a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-B	ILY	rRFLP, cRFLP	Italian lettuce yellows	<i>Lactuca sativa</i> (lettuce)	Italy	Vibio <i>et al.</i> , 1994; Marcone <i>et al.</i> , 1997b
I-B	HyPh1, BHy, LHV	rRFLP, cRFLP	Hydrangea phyllody	<i>Hydrangea macrophylla</i> (French hydrangea)	Europe	Lee <i>et al.</i> , 1993c; Vibio <i>et al.</i> , 1996; Marcone <i>et al.</i> , 1997b

I-B	AAV	FS, rRFLP,	American aster yellows	<i>Allium cepa</i> (onion)	Florida	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Marcone <i>et al.</i> , 1997a
I-B	OY	PS, SS, rRFLP	Onion yellows and virescence		Japan, Italy	Namba <i>et al.</i> , 1993; Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Vibio <i>et al.</i> , 1995b
I-B	GIY	rRFLP, cRFLP	Gladiolus yellows	<i>Gladiolus</i> hybrid (gladiolus)	Europe	Bertaccini and Vibio, 1996; Vibio <i>et al.</i> , 1996
I-B	ICV	rRFLP	Italian cabbage yellows	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> (cabbage)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997b
I-B	IBP	rRFLP	Broccoli phyllody	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> (sprouting broccoli)	Italy	Bertaccini and Vibio, 1996
I-B	SIKP	rRFLP	Kale phyllody	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>palmifolia</i> (kale)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997b
I-B	TPV	rRFLP	Turnip virescence	<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapifera</i> (turnip)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997b
I-B		rRFLP	Big bud	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	Italy, Japan	Marcone <i>et al.</i> , 1997b; Okuda <i>et al.</i> , 1997
I-B	SICV	rRFLP	Calendula virescence	<i>Calendula officinalis</i> (pot marigold)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997a
I-B	PV	rRFLP	Papaver virescence	<i>Papaver rhoeas</i> (corn poppy)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997c
I-B	WRV	rRFLP	Wild radish yellows	<i>Raphanus raphanistrum</i> (wild radish)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997c
I-B	POV	rRFLP	Portulaca yellows	<i>Portulaca oleracea</i> (purslane)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997c; Schneider <i>et al.</i> , 1997b
I-B	ErY	rRFLP	Cyclamen virescence	<i>Cyclamen persicum</i> (cyclamen)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1997b
I-B		rRFLP	Erigeron yellows	<i>Erigeron canadensis</i> (horseweed)	USA	Lee <i>et al.</i> , 1994
I-B		rRFLP	Astroemeria decline	<i>Astroemeria</i> sp. (astroemeria)	Italy	Bertaccini and Vibio, 1996
I-B		rRFLP	Ranunculus phyllody	<i>Ranunculus asiaticus</i> (Persian buttercup)	Italy	Vibio <i>et al.</i> , 1997
I-B		rRFLP	Mallow yellows	<i>Malva</i> sp. (mallow)	Italy	Vibio <i>et al.</i> , 1997
I-B		rRFLP, cRFLP	Ragweed yellows	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (common ragweed)	Florida	Harrison <i>et al.</i> , 1996
I-B		rRFLP, cRFLP	Dogfennel yellows	<i>Eupatorium capillifolium</i> (dogfennel)	Florida	Harrison <i>et al.</i> , 1996
I-B		rRFLP	Poplar witches'-broom	<i>Populus nigra</i> 'Italica' (Lombardy poplar)	France	Berges <i>et al.</i> , 1997
I-B	JHW	rRFLP	Mitsuba witches'-broom	<i>Cryptotaenia japonica</i> (Japanese honeysuckle)	Japan	Okuda <i>et al.</i> , 1997
I-B	MD	FS	Mulberry dwarf	<i>Morus bombycis</i> (mulberry)	Japan	Namba <i>et al.</i> , 1993
I-B	GCW	rRFLP	Chrysanthemum witches'-broom	<i>Chrysanthemum coronarium</i> (crown daisy)	Japan	Okuda <i>et al.</i> , 1997
I-B	ED	rRFLP	Eggplant dwarf	<i>Solanum melongena</i> (eggplant)	Japan	Okuda <i>et al.</i> , 1997
I-B		rRFLP	Unknown	<i>Prunus armeniaca</i> (apricot)	Italy	Lee <i>et al.</i> , 1995a



Subgroup <sup>1</sup>	Strain/phytoplasma acronym(s)	Evidence of identity or similarity <sup>2</sup>	Disease	Plant or insect host	Geographic area	Selected references
I-B		rRFLP	Unknown	<i>Prunus persica</i> var. <i>nectarina</i> (nectarine)	Italy	Lee <i>et al.</i> , 1995a
I-B		rRFLP	Unknown	<i>Prunus salicina</i> (Japanese plum)	Italy	Lee <i>et al.</i> , 1995a
I-B		rRFLP	Unknown	<i>Trifolium pratense</i> (red clover)	Italy	Lee <i>et al.</i> , 1994
I-B		rRFLP	Unknown	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	Canada	Lee <i>et al.</i> , 1994
I-B		rRFLP	Unknown	<i>Celtis australis</i> (European hackberry)	Italy	Bertaccini <i>et al.</i> , 1996b
I-B		rRFLP	Unknown	<i>Ulmus</i> sp. (elm)	Italy	Lee <i>et al.</i> , 1995b
I-B		rRFLP	Grapevine yellows	<i>Vitis vinifera</i> (grapevine)	Italy	Alma <i>et al.</i> , 1996
I-B		rRFLP	Unknown	<i>Metcalfa pruinosa</i> (planthopper)	Italy	Danielli <i>et al.</i> , 1996a
I-B		rRFLP	Mosaic, Free-branching, asymptomatic	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (Christmas poinsettia)	Italy	Bertaccini <i>et al.</i> , 1996a, 1996c
I-B		rRFLP	Olive witches'-broom	<i>Olea europaea</i> (olive)	Italy	Danielli <i>et al.</i> , 1996b
I-B		rRFLP	Eucalyptus yellows	<i>Eucalyptus</i> spp. (eucalypt)	Italy	Bertaccini and Vibio, 1996
I-B		rRFLP	Myrtle yellows	<i>Myrtus communis</i> (myrtle)	Italy	Bertaccini and Vibio, 1996
I-B (π-tp)	IOWB	rRFLP, cRFLP	Ipomoea obscure witches'-broom	<i>Ipomoea obscura</i>	Taiwan	Lee <i>et al.</i> , 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-B (π-tp)	MBS	rRFLP, cRFLP	Maize bushy stunt	<i>Zea mays</i> (corn)	Mexico, Ohio	Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-B (cRFLP)	OAY	FS, SS, rRFLP, cRFLP	Oenothera virescence	<i>Oenothera hookeri</i> (evening primrose)	Michigan	Lim and Sears, 1989; Kuske <i>et al.</i> , 1991; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-B (cRFLP, S-a)	CL, RV	rRFLP, cRFLP, S	Chlorantia	<i>Brassica napus</i> (rape)	France	Kuske <i>et al.</i> , 1991; Keane <i>et al.</i> , 1996; Vibio <i>et al.</i> , 1996;
I-B (S-a)	SAY	FS, SS, rRFLP, cRFLP, S	Severe western aster yellows	<i>Apium graveolens</i> (celery)	California	Kuske and Kirkpatrick, 1992; Lee <i>et al.</i> , 1993c; Keane <i>et al.</i> , 1996
I-B (S-a)	CC	rRFLP, cRFLP, S	Cactus virescence	<i>Opuntia</i> sp. (cactus)	UK	Keane <i>et al.</i> , 1996; Vibio <i>et al.</i> , 1996
I-B (S-b)	PY	rRFLP, cRFLP, S	Primula yellows	<i>Primula</i> sp. (primrose)	Germany	Keane <i>et al.</i> , 1996; Vibio <i>et al.</i> , 1996
I-B (S-c)	KD	rRFLP, cRFLP, S	Koolsard	<i>Brassica</i> sp. (cabbage)	UK	Keane <i>et al.</i> , 1996; Vibio <i>et al.</i> , 1996
I-B (cRFLP, S-d)	EAY, AV2192	rRFLP, cRFLP, SS, S	European aster yellows	<i>Callistephus chinensis</i> (China aster)	Germany	Kuske <i>et al.</i> , 1991; Keane <i>et al.</i> , 1996; Vibio <i>et al.</i> , 1996
? I-B		rRFLP	Cardaria phylloidy	<i>Cardaria draba</i> (hoary cress)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1997b
? I-B		rRFLP	Bunias phylloidy	<i>Bunias orientalis</i> (hill mustard)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1997b
? I-B		rRFLP	Stellaria yellows	<i>Stellaria media</i> (common chickweed)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1997b
? I-B		rRFLP	Carrot proliferation	<i>Daucus carota</i> (carrot)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1997b
? I-B	AKV	rRFLP, cRFLP	Columbine virescence	<i>Aquilegia alpina</i> (columbine)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b
? I-B	DEV	rRFLP, cRFLP	Larkspur virescence	<i>Delphinium</i> hybrid (larkspur)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b

? I-B	DIV	rRFLP, cRFLP	Diplotaxis virescence	Diplotaxis erucoides (rocket)	Spain	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b
? I-B	PVM, PVW	rRFLP, cRFLP	Plantain virescence	<i>Plantago</i> spp. (plantain)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b
I-C	CPh	FS, rRFLP, cRFLP	Clover phyllody	<i>Trifolium sativum</i> (red clover)	Canada	Lee <i>et al.</i> , 1992a, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> 1996
I-C	KVG, KV, KVF, KVE	FS, rRFLP, cRFLP, S	Clover phyllody	<i>Trifolium repens</i> (white clover)	Europe	Clark <i>et al.</i> , 1983; Firrao <i>et al.</i> , 1996a; Schneider <i>et al.</i> , 1997b
I-C	SGP	rRFLP, cRFLP, S	Strawberry green petal	<i>Fragaria x ananassa</i> (strawberry)	North America, Europe	Clark <i>et al.</i> , 1983; Gundersen <i>et al.</i> , 1996; Honet Degrová <i>et al.</i> , 1996
I-C		rRFLP	Anemone virescence	<i>Anemone coronaria</i> (poppy anemone)	Italy	Vibio <i>et al.</i> , 1995a
I-C	SP1	rRFLP	Spirea stunt	<i>Spiraea tomentosa</i> (spirea)	USA	Lee <i>et al.</i> , 1994
I-C		rRFLP	Alstroemeria decline	<i>Alstroemeria</i> sp. (alstroemeria)	Italy	Bertaccini and Vibio, 1996
I-C		rRFLP	Unknown	<i>Celtis australis</i> (European hackberry)	Italy	Bertaccini <i>et al.</i> , 1996
I-C		rRFLP	Unknown	<i>Metcalfe pruinosa</i> (planthopper)	Italy	Danielli <i>et al.</i> , 1996a
I-C		rRFLP	Mosaic, asymptomatic	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (Christmas poinsettia)	Italy	Bertaccini <i>et al.</i> , 1996c
I-C		rRFLP	Olive witches'-broom	<i>Olea europaea</i> (olive)	Italy	Danielli <i>et al.</i> , 1996b
I-C		rRFLP	Eucalyptus yellows	<i>Eucalyptus</i> sp. (eucalypt)	Italy	Bertaccini and Vibio, 1996
I-C (rr-rp)	RPy	rRFLP, cRFLP	Ranunculus phyllody	<i>Ranunculus</i> sp. (buttercup)	Italy	Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-D	PaWB	PS, rRFLP	Paulownia witches'-broom	<i>Paulownia tomentosa</i> (paulownia)	Taiwan	Lee <i>et al.</i> , 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-E	BBS	PS, rRFLP, cRFLP	Blueberry stunt	<i>Vaccinium</i> spp. (blueberry)	USA	Lee <i>et al.</i> , 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
I-F	AYA (ACLR)	FS, rRFLP	Unknown	<i>Prunus armeniaca</i> (apricot)	Spain	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Seemüller <i>et al.</i> , 1994
I-H	CYb	rRFLP, cRFLP	Chrysanthemum yellows	<i>Chrysanthemum frutescens</i> (marguerite)	Italy	Gundersen <i>et al.</i> , 1996
Subgroup <sup>1</sup>	Strain/phytoplasma acronym(s)	Evidence of identity or similarity <sup>2</sup>	Disease	Plant or insect host	Geographic area	Selected references



Subgroup <sup>1</sup>	Strain/phytoplasma acronym(s)	Evidence of identity or similarity <sup>2</sup>	Disease	Plant or insect host	Geographic area	Selected references
I-I Mexican periwinkle virescence phytoplasma I-I	MPV	rRFLP, cRFLP	Periwinkle virescence	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	Mexico	Gundersen <i>et al.</i> , 1996
		rRFLP	Strawberry green petal, stunting	<i>Fragaria x ananassa</i> (strawberry)	Florida	Jomantien <i>et al.</i> , 1996; Harrison <i>et al.</i> , 1997
	FWB	rRFLP	Periwinkle witches'-broom	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	Florida	Harrison <i>et al.</i> , 1996
Subgroup unclear	COL	rRFLP, cRFLP	Latent	<i>Cuscuta odorata</i> (dodder)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b
	CVL	rRFLP, cRFLP	Periwinkle virescence	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	Peru	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b
	CVT	rRFLP, cRFLP	Periwinkle virescence	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	Thailand	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b
	MPY	DB	Periwinkle yellows	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	Malaysia	Khew <i>et al.</i> , 1991
	SAS	rRFLP, cRFLP	Sandal spike	<i>Santalum album</i> (sandalwood)	India	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b
	SAPP	SS, rRFLP, cRFLP, S	Safflower phyllody	<i>Charthamus tinctorius</i> (safflower)	Israel	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Schneider and Seemüller, 1994b
		DB	Pumpkin yellows	<i>Cucurbita pepo</i> (pumpkin)	Italy	Minucci <i>et al.</i> , 1995
		rRFLP	Monarda yellows	<i>Monarda fistulosa</i> (wild bergamot)	Canada	Khadhair <i>et al.</i> , 1997
		S	Lotus yellows	<i>Lotus corniculatus</i> (bird's-foot trefoil)	USA	Griffiths <i>et al.</i> , 1994a
		S	New England aster yellows	<i>Aster novae-angliae</i> (New England aster)	USA	Griffiths <i>et al.</i> , 1994a
		rRFLP	Poplar yellows	<i>Populus</i> spp. (poplar)	Europe	Berges <i>et al.</i> , 1997

Table 2. Classification of non-astri

Phytoplasma group and group members associated with the diseases listed <sup>1</sup>	Acronym(s) of phyto-plasma	Evidence of identity or similarity <sup>2</sup>	Plant or insect host	Geographic area	Selected references
<b>AUSTRALIAN GRAPEVINE YELLOW (AUSGY) GROUP</b>					
Australian grapevine yellows (Cand. Phytopl. australiense)	AUSGY	FS, rRFLP, cRFLP	<i>Vitis vinifera</i> (grapevine)	Australia	Padovan <i>et al.</i> , 1996; Davis <i>et al.</i> , 1997a
= Papaya dieback		rRFLP	<i>Carica papaya</i> (papaya)	Australia	Gibb <i>et al.</i> , 1996
Phormium yellow leaf	PYL	FS, cRFLP	<i>Phormium tenax</i> (New Zealand flax)	New Zealand	Liefting <i>et al.</i> , 1996
<b>ITALIAN BINDWEED STOLBUR (IBS) GROUP</b>					
Italian bindweed stolbur	IBS	FS, rRFLP	<i>Convolvulus arvensis</i> (field bindweed)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997a
<b>STOLBUR (STOL) GROUP</b>					
Stolbur of pepper	STOL	FS, SS, RFLP, cRFLP, S	<i>Capsicum annuum</i> (pepper)	France, Serbia	Fos <i>et al.</i> , 1992; Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Marcone <i>et al.</i> , 1997a
= Tomato stolbur	STOL	SS, rRFLP, cRFLP, S	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	Europe	Fos <i>et al.</i> , 1992; Boudon-Padieu <i>et al.</i> , 1996; Marcone <i>et al.</i> , 1997b
= Tobacco stolbur	STOL	rRFLP, S	<i>Nicotiana tabacum</i> (tobacco)	France, Italy	Fos <i>et al.</i> , 1992; C. Marcone, unpublished
= Eggplant stolbur		S	<i>Solanum melongena</i> (eggplant)	France	Fos <i>et al.</i> , 1992
= Strawberry yellows		S	<i>Fragaria x ananassa</i> (strawberry)	France	Fos <i>et al.</i> , 1992
= Porcelain disease		S	<i>Apium graveolens</i> (celery)	France	Fos <i>et al.</i> , 1992
= Periwinkle yellows		S	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	France	Fos <i>et al.</i> , 1992
= Nightshade proliferation		S	<i>Solanum dulcamara</i> (bittersweet nightshade)	France	Fos <i>et al.</i> , 1992
= Lycopersicon hirsutum little leaf		S	<i>Lycopersicon hirsutum</i>	France	Fos <i>et al.</i> , 1992
= Leafhopper-borne		S	<i>Hyalesthes obsoletus</i> (planthopper)	France	Fos <i>et al.</i> , 1992; Maixner <i>et al.</i> , 1995;
= Bindweed yellows		rRFLP, S	<i>Convolvulus arvensis</i> (field bindweed)	France, Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1997b
= Bois noir, Vergilbungs-krankheit, other grapevine yellows	BN, VK	FS, SS, rRFLP, cRFLP	<i>Vitis vinifera</i> (grapevine)	Europe	Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Marcone <i>et al.</i> , 1996a; Daire <i>et al.</i> , 1997
<b>BUCKTHORN WITCHES'-BROOM (BWB) GROUP</b>					
Buckthorn witches'-broom	BWB, BABW	FS, rRFLP	<i>Rhamnus catharticus</i> (buckthorn)	Germany	Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Mäurer and Seemüller, 1996
<b>SPARTIUM WITCHES'-BROOM (SpaWB) GROUP</b>					
Spartium witches'-broom	SpaWB	FS, rRFLP	<i>Spartium junceum</i> (Spanish broom)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1996b
Sarothamnus witches'-broom	SSWB	rRFLP	<i>Sarothamnus scoparius</i> (broom)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997f

(continued)



Phytoplasma group and group members associated with the diseases listed	Acronym(s) of phytoplasma	Evidence of identity or similarity <sup>2</sup>	Plant or insect host	Geographic area	Selected references
<b>APPLE PROLIFERATION (AP) GROUP</b>					
Apple proliferation	AP	FS, SS, rRFLP, cRFLP	<i>Malus domestica</i> (apple)	Europe	Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Lorenz <i>et al.</i> , 1995
= Hazel decline		rRFLP	<i>Corylus avellana</i> (hazel)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1996c
= Bindweed yellows	PD	rRFLP	<i>Convolvulus arvensis</i> (field bindweed)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1997
Pear decline		FS, SS, rRFLP	<i>Pyrus communis</i> (pear)	Europe, North America	Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Kison <i>et al.</i> , 1997
= Peach yellow leaf roll	PYLR	FS, rRFLP	<i>Prunus persica</i> (peach)	North America	Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Kison <i>et al.</i> , 1997
= Hazel decline		rRFLP	<i>Corylus avellana</i> (hazel)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1996c
European stone fruit yellows of peach	ESFY	FS, SS, rRFLP, cRFLP	<i>Prunus persica</i> (peach)	Europe	Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Kison <i>et al.</i> , 1997
= European stone fruit yellows of apricot (Apricot chlorotic leaf roll)	ESFY (ACLR)	SS, rRFLP, cRFLP	<i>Prunus armeniaca</i> (apricot)	Europe	Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Lorenz <i>et al.</i> , 1994; Kison <i>et al.</i> , 1997
= European stone fruit yellows of Jap. plum (Plum leptonecrosis)	ESFY (PLN)	rRFLP, cRFLP	<i>Prunus salicina</i> (Japanese plum)	Europe	Lorenz <i>et al.</i> , 1994; Marcone <i>et al.</i> , 1996c
= European stone fruit yell. of flowering cherry	ESFY	rRFLP, cRFLP	<i>P. serrulata</i> (flowering cherry)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Lorenz <i>et al.</i> , 1994
= European stone fruit yellows of Europ. plum	ESFY	rRFLP, cRFLP	<i>Prunus domestica</i> (European plum)	Europe	Lorenz <i>et al.</i> , 1994
= European stone fruit yellows of almond	ESFY	rRFLP, cRFLP	<i>P. amygdaliformis</i> (almond)	Europe	Lorenz <i>et al.</i> , 1994
= Hazel decline		rRFLP	<i>Corylus avellana</i> (hazel)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1996c
<b>X-DISEASE (WX) GROUP</b>					
Western X-disease	WX	FS, SS, rRFLP, cRFLP, S	<i>Prunus persica</i> (peach)	Western USA	Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Schneider <i>et al.</i> , 1995b; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
= Disease unknown	PDX	SS, rRFLP, cRFLP	<i>Pyrus communis</i> (pear)	California	Gundersen <i>et al.</i> , 1996
= Erigeron yellows	ErY4	rRFLP	<i>Erigeron canadensis</i> (horseweed)	USA	Lee <i>et al.</i> , 1994
= Goldenrod stunt	GS1	rRFLP	<i>Solidago rugosa</i> (goldenrod)	USA	Lee <i>et al.</i> , 1994
= Free-branching of Christmas poinsettia		rRFLP	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (Christmas poinsettia)	USA	Abad <i>et al.</i> , 1997
Canadian peach X-disease	CX	FS, rRFLP, cRFLP, S	<i>Prunus persica</i> (peach)	Canada	Lee <i>et al.</i> , 1992b, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
= Chokecherry X-disease	CCX	PS, rRFLP, cRFLP, S	<i>Prunus virginiana</i> (chokecherry)	USA	Gundersen <i>et al.</i> , 1996; Guo <i>et al.</i> , 1996
Clover yellow edge	CYE	FS, rRFLP, cRFLP, S	<i>Trifolium repens</i> (white clover)	Canada	Shina and Benhamou, 1983; Lee <i>et al.</i> , 1992b; Gundersen <i>et al.</i> , 1996

= Gentian witches'-broom = Grapevine yellows	GW FDV/A, FDU	rRFLP rRFLP, cRFLP, S	<i>Gentiana</i> sp. (gentian) <i>Vitis vinifera</i> (grapevine)	Japan USA, Italy	Okuda <i>et al.</i> , 1997 Prince <i>et al.</i> , 1993; Chen <i>et al.</i> , 1993; Marcone <i>et al.</i> , 1996a Firrao <i>et al.</i> , 1996a
= Oxeye phyllody	OxP	rRFLP, cRFLP	<i>Chrysanthemum leucanthemum</i> (oxeye daisy)	Italy	Firrao <i>et al.</i> , 1996a
= Taraxacum yellows	= TaY	rRFLP, cRFLP	<i>Taraxacum officinale</i> (dandelion)	Italy	Firrao <i>et al.</i> , 1996a
= Crepis yellows	= CreY	rRFLP, cRFLP	<i>Crepis biennis</i> (rough hawk's beard)	Italy	Firrao <i>et al.</i> , 1996a
= Free-branching of Christmas poinsettia		rRFLP	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (Christmas poinsettia)	USA	Abad <i>et al.</i> , 1997
Milkweed yellows	MWY	rRFLP, cRFLP	<i>Asclepias syriaca</i> (milkweed)	USA	Griffiths <i>et al.</i> , 1994c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
Italian clover phyllody	ICPh	FS, rRFLP, cRFLP, S	<i>Trifolium</i> sp. (clover)	Italy	Firrao <i>et al.</i> , 1996a, 1996b
Pecan bunch	PB	rRFLP, cRFLP	<i>Carya illinoensis</i> (pecan)	USA	Gundersen <i>et al.</i> , 1996
Goldenrod yellows	GR1	rRFLP, cRFLP	<i>Solidago rigosa</i> (goldenrod)	USA	Griffiths <i>et al.</i> , 1994c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
Walnut witches'-broom	WWB	SS, rRFLP, cRFLP, S	<i>Juglans nigra</i> (black walnut)	USA	Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Gundersen <i>et al.</i> , 1996; Firrao <i>et al.</i> , 1996b
Spirea stunt	SP1	rRFLP, cRFLP	<i>Spiraea</i> sp. (spirea)	USA	Griffiths <i>et al.</i> , 1994c; Gundersen <i>et al.</i> , 1996
Free-branching of Christmas poinsettia		rRFLP	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (Christmas poinsettia)	USA	Lee <i>et al.</i> , 1997a
Vaccinium witches'-broom	VAC	FS, SS, rRFLP, S	<i>Vaccinium myrtillus</i> (blueberry)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1993; Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Seemüller <i>et al.</i> , 1994
Tsuwabuki witches'-broom	TWB	FS, rRFLP	<i>Farfugium japonicum</i> (tsuwabuki)	Japan	Namba <i>et al.</i> , 1993; Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Okuda <i>et al.</i> , 1997
? Green Valley X-disease	GVX	rRFLP, cRFLP	<i>Prunus avium</i> (cherry)	California	Ahrens <i>et al.</i> , 1993
? Peach yellows	PY	cRFLP	<i>Prunus persica</i> (peach)	USA	Kirkpatrick, 1991
? Peach rosette	PR	SS, cRFLP, S	<i>Prunus persica</i> (peach)	USA	Kirkpatrick, 1991; Firrao <i>et al.</i> , 1996b
? Brazilian tomato big bud	BTBB	rRFLP, S	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	Brasil	Boudon-Padieu <i>et al.</i> , 1996
? Dodonea yellows	DoY	SS, DB	<i>Dodonaea viscosa</i>	Hawaii	Borth <i>et al.</i> , 1995
? Horseweed phyllody		rRFLP	<i>Erigeron canadensis</i> (horseweed)	USA	Schneider <i>et al.</i> , 1997b
<b>ITALIAN ALFALFA WITCHES'-BROOM (IAWB) GROUP</b>					
Italian alfalfa witches'-broom	IAWB	FS, rRFLP	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997b
Picris echinoides phyllody	PEP	FS, rRFLP	<i>Picris echinoides</i> (bristly ox-tongue)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997a
<b>FABA BEAN PHYLLODY (FBP) GROUP</b>					
Faba bean phyllody	FBP	FS, SS, rRFLP	<i>Vicia faba</i> (faba bean)	Sudan	Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994; Schneider <i>et al.</i> , 1995a
= Crotalaria phyllody	CrP (CJP)	rRFLP, S	<i>Crotalaria juncea</i> (sunn hemp)	Thailand	Saeed <i>et al.</i> , 1994; Schneider <i>et al.</i> , 1995a
= Crotalaria saltiana phyllody	CSP	rRFLP, S	<i>Crotalaria saltiana</i>	Sudan	Saeed <i>et al.</i> , 1994; Schneider <i>et al.</i> , 1995a
= Soybean phyllody	SoyP	rRFLP, S	<i>Glycine max</i> (soybean)	Thailand	Saeed <i>et al.</i> , 1994; Schneider <i>et al.</i> , 1995a
Cotton phyllody	CoP	rRFLP	<i>Gossypium hirsutum</i> (cotton)	Burkina Faso	Schneider <i>et al.</i> , 1997b; C. Marcone, unpublished result







PIGEON PEA WITCHES' -BROOM (PPWB) GROUP				Host Plant	Location	Reference			
Pigeon pea witches'-broom	PPWB	FS, rRFLP, DB	CIRSIUM PHYLLODY (CirP) GROUP				Cajanus cajan (pigeon pea)	Florida	Lee <i>et al.</i> , 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1994; N.A. Harrison <i>et al.</i> , unpublished
Caribbean pigeon pea witches'-broom	CPPWB	FS							
Echium vulgare yellows	EVY	FS, rRFLP							
= Crepis setosa phyllody	CrSP	rRFLP							
= Picris echioides phyllody	PIEP	rRFLP	SUGARCANE WHITE LEAF (SCWL) GROUP	Cirsium arvense (Canada thistle)	Germany	Schneider <i>et al.</i> , 1997b			
Knautia phyllody	KAP	rRFLP							
CIRSIUM PHYLLODY (CirP) GROUP									
Cirsium phyllody	CirP	FS, rRFLP							
SUGARCANE WHITE LEAF (SCWL) GROUP							Thailand	Saccharum officinarum (sugarcane)	Thailand
Sugarcane white leaf	SCWL	FS, rRFLP, DB, S							
Sugarcane grassy shoot	SCGS	SS, rRFLP							
Rice yellow dwarf	RYD	FS, SS, rRFLP, DB							
Leafhopper-borne	BVK	FS, rRFLP							
BERMUDA GRASS WHITE LEAF (BGWL) GROUP				Italy, Thailand, India	Cynodon dactylon (Bermuda grass)	Sarindu and Clark, 1993; Marcone <i>et al.</i> , 1997d; Wongkaew <i>et al.</i> , 1997			
Bermuda grass white leaf	BGWL	FS, SS, rRFLP, S							
= Annual blue grass white leaf	ABGWL	rRFLP							
Brachiaria white leaf	BRAWL	SS, rRFLP, S							
? Dactyloctenium white leaf	DACWL	SS, rRFLP							
TANZANIAN LETHAL DECLINE (TLD) GROUP				Tanzania, Kenya	Cocos nucifera (coconut palm)	Harrison <i>et al.</i> , 1994a; Tymon <i>et al.</i> , 1997			
Tanzanian lethal decline	TLD	FS, rRFLP							
Cape St. Paul wilt	CPSW	rRFLP							
= Awka disease	AWAT	rRFLP							
LETHAL YELLOWING (LY) GROUP				Florida	Cocos nucifera (Coconut palm)	Gundersen <i>et al.</i> , 1994; Harrison <i>et al.</i> , 1994b; Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994			
Coconut lethal yellowing	LY	FS, PS, SS, rRFLP, DB							
= Lethal yellowing of other palms		rRFLP							
Yucatan lethal decline	YLD	FS, rRFLP							

Phytoplasma group and group members associated with the diseases listed <sup>1</sup>	Acronym(s) of phyto-plasma	Evidence of identity or similarity <sup>2</sup>	Plant or insect host	Geographic area	Selected references
<b>LOOF AH WITCHES'-BROOM (LWB) GROUP</b>					
Loofah witches'-broom	LWB	FS, rRFLP	<i>Luffa cylindrica</i> (loofah)	Taiwan	Lee <i>et al.</i> , 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1994
<b>ASH YELLOWS (AshY) GROUP</b>					
Ash yellows	AshY	FS, SS, RFLP, cRFLP	<i>Fraxinus</i> spp. (ash)	USA	Mäurer <i>et al.</i> , 1993; Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Griffiths <i>et al.</i> , 1994a
= Lilac witches'-broom	LWB	rRFLP	<i>Syringa</i> spp. (lilac)	USA	Griffiths <i>et al.</i> , 1994a
<b>CLOVER PROLIFERATION (CP) GROUP</b>					
Clover proliferation	CP	FS, rRFLP, cRFLP	<i>Trifolium hybridum</i> (alsike clover)	Canada	Lee <i>et al.</i> , 1991, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1994
= Potato witches'-broom	PWB	PS, rRFLP, cRFLP	<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	Canada	Lee <i>et al.</i> , 1991, 1993c; Gundersen <i>et al.</i> , 1994
= Alfalfa witches'-broom	AWB	cRFLP	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	Canada	Khadhair and Hiruki, 1995
= Beet leafhopper transmitted virescence	BLTVA	PS, rRFLP	<i>Catharanthus roseus</i> (periwinkle)	California	Lee <i>et al.</i> , 1991; Gundersen <i>et al.</i> , 1994; Kirkpatrick <i>et al.</i> , 1994
= California tomato big bud	WWP	rRFLP	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato)	California	Shaw <i>et al.</i> , 1993
Willow witches'-broom	WWP	cRFLP	<i>Salix</i> spp. (willow)	Canada	Khadhair and Hiruki, 1995
Brinjal little leaf	BLL	FS, rRFLP	<i>Solanum melongena</i> (eggplant)	India	Schneider <i>et al.</i> , 1995a
<b>ELM YELLOWS (EY) GROUP</b>					
Elm yellows	EY, ULW	FS, SS, RFLP, cRFLP	<i>Ulmus</i> spp. (elm)	USA, Europe	Lee <i>et al.</i> , 1993b; Mäurer <i>et al.</i> , 1993; Marcone <i>et al.</i> , 1997e
Flavescence dorée	FD	FS, rRFLP, cRFLP, S	<i>Vitis vinifera</i> (grapevine)	France	Seemüller <i>et al.</i> , 1994; Daire <i>et al.</i> , 1997; Marcone <i>et al.</i> , 1997e
German flavescence dorée	GFD	cRFLP	<i>Vitis vinifera</i> (grapevine)	Germany	Daire <i>et al.</i> , 1997
Alder yellows	ALD	FS, rRFLP	<i>Alnus glutinosa</i> (European alder)	Europe	Marcone <i>et al.</i> , 1997e
= Eucalyptus little leaf	ELL	rRFLP	<i>Eucalyptus</i> spp. (eucalypt)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1996d
= Spartium witches'-broom	SpaWB	rRFLP	<i>Spartium junceum</i> (Spanish broom)	Italy	Marcone <i>et al.</i> , 1997e
Rubus stunt	RuS	FS, cRFLP, rRFLP	<i>Rubus</i> spp. (brambles)	Europe	Mäurer and Seemüller, 1994; Marcone <i>et al.</i> , 1997e
Cherry lethal yellows	CLY	rRFLP, cRFLP	<i>Prunus avium</i> (sweet cherry)	China	Zhu <i>et al.</i> , 1996
Hemp dogbane yellows	HD1	rRFLP	<i>Apocynum cannabinum</i> (hemp dogbane)	New York State	Griffiths <i>et al.</i> , 1994b
Jujube witches'-broom	JWB	rRFLP, cRFLP	<i>Ziziphus jujuba</i> (jujube)	China	Zhu <i>et al.</i> , 1996
? Olive yellows		rRFLP	<i>Olea europaea</i> (olive)	Italy	Poggi Pollini <i>et al.</i> , 1996





## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek: Dr. Süle Sándornak, aki felkarolta a fitoplazma-kutatást Magyarországon és lehetőséget biztosított számomra, hogy ezzel a rendkívül érdekes és új területtel foglalkozhassak; Dr. Erich Seemüllernek, Dr. Michael Bergnek és Dr. Uli Lauernak a fitoplazma kutatásban általuk alkalmazott módszerek szíves átadásáért; Dr. Gáborjányi Richardnak a számos fitoplazma fertőzött növénymintáért és fényképért; Dr. Tóbiás Istvánnak ugyancsak a beteg növénymintákért; kollégáimnak, Mergenthaler Emesének és Fodor Márknak a munka során nyújtott segítségükért; valamint családomnak, barátaimnak és mindenkinek, aki közvetett, vagy közvetlen módon támogatott.

## **NYILATKOZAT**

Alulírott, Viczián Orsolya nyilatkozom, hogy a disszertációban foglaltak saját munkámon alapuló eredmények. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem és a vonatkozó jogszabályokat betartottam.